



**SKRIPSI – TK141581**

**STUDI TEKNIK PRODUKSI ETANOL DARI  
LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull /  
Endocarp*)**

**Oleh :**

**Fibrillian Zata Lini**

**NRP. 2313105006**

**Fixalis Oktafia**

**NRP. 2313105040**

**Dosen Pembimbing :**

**Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng**

**NIP. 196110211986031001**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA  
2015**



**FINAL PROJECT –TK141581**

**STUDY OF ETHANOL PRODUCTION FROM  
COFFEE PULP (*Parchment Hull / Endocarp*)**

**By:**

**Fibrillian Zata Lini**

**NRP. 2313 105 006**

**Fixalis Oktafia**

**NRP. 2313 105 040**

**Advisor Lecturer :**

**Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng**

**NIP. 196110211986031001**

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT  
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### STUDI TEKNIK PRODUKSI ETANOL DARI LIMBAH KULIT BIJI KOPI (*Parchment hull / Endocarp*)

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar  
Sarjana Teknik pada Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh:

**Fibrillian Zata Lini**

**2313 105 006**

**Fixalis Oktafia**

**2313 105 040**

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng

.....(Pembimbing I)

2. Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng

.....(Penguji I)

3. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D

.....(Penguji II)

4. Dr. Ir. Sri Rachmania Juliastuti, M.Eng

.....(Penguji III)

**Surabaya, Juli 2015**



# **STUDI TEKNIK PRODUKSI ETANOL DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull / endocarp*)**

**Nama /NRP :**

**1. Fibrillian Zata Lini                      NRP. 2313105006**

**2. Fixalis Oktafia                              NRP. 2313105040**

**Jurusan : Teknik Kimia**

**Dosen Pembimbing : Prof. Dr.Ir. Tri Widjaja, M. Eng.**

## **ABSTRAK**

Dunia sedang menghadapi problem penggunaan energi berbasis fosil seperti minyak bumi dan gas alam, yang semakin langka karena tidak dapat diperbarui. Oleh karena itu penemuan sumber energi dari bahan yang dapat diperbarui sangat dibutuhkan untuk memenuhi kebutuhan energi dunia yang semakin meningkat. Salah satu bahan baku yang digunakan untuk menghasilkan glukosa dan xilosa adalah limbah kulit buah kopi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menghasilkan bioethanol dari kulit kopi dengan memanfaatkan baik komponen selulosa maupun hemiselulosanya. Kulit kopi dipilih karena jumlahnya mencapai 743 kg/ha dan belum dimanfaatkan secara baik dan optimal. Komposisi kimia limbah kulit buah kopi terdiri dari 63% selulosa; 2,3% hemiselulosa; 17% lignin; 11,5% protein; 1,8-8,56% tanin dan 6,5% pektin. Namun, pada komposisi kimia kulit kopi mengandung kadar lignin yang cukup tinggi. Oleh karena itu harus dilakukan pretreatment untuk menurunkan kadar lignin. Berdasarkan literature, metode organosolv mampu menghasilkan sejumlah besar lignin berkualitas tinggi yang relatif murni tetapi juga mampu melarutkan sebagian besar hemiselulosa. Selain itu, substrat dari pretreatment organosolv

memiliki aktifitas enzimatik yang tinggi dari pada metode alternatif lainnya. Untuk membuktikan bahwa proses organosolv efektif dalam menurunkan lignin, maka digunakan pretreatment pembanding dengan menggunakan metode alkali. Selulosa dan hemiselulosa yang dihasilkan dari pretreatment kimia kemudian dihidrolisis menggunakan enzim selulase murni dan enzim xilanase murni untuk merubah menjadi glukosa dan xilosa. Namun, dari segi ekonomi, harga enzim murni cukup mahal maka dari itu kami menggunakan crude enzim. Dari hasil yang didapat, kadar gula reduksi terbanyak diperoleh dari hidrolisa menggunakan enzim murni. Kemudian dilakukan fermentasi menggunakan variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* untuk menguraikan xilosa dan glukosa menjadi etanol.

***Kata Kunci*** : Limbah kulit buah kopi, Metode Pretreatment Organosolv, Hidrolisa Enzim, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*.



method, is used. Cellulose and hemicellulose which are generated from the chemical pretreatment, is being hydrolyzed using pure cellulase enzymes and pure xylanase enzyme to convert it into glucose and xylose. However, in economic terms, the price of pure enzyme is quite expensive, therefore we use the crude enzyme. From the results, we obtained that the highest content of sugars reduction derived from hydrolysis using pure enzyme. And then fermentation using microorganisms variation *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* ferment xilosa and glucose to be ethanol.

**Keywords** : *Waste coffee pulp, Organosolv pretreatment methode, Enzymatic Hydrolysis, Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis.*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga kami dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul :

### **“STUDI TEKNIK PRODUKSI ETANOL DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull/Endocarp*) “**

Setelah hampir dua tahun menjalani Tahap Sarjana Program Studi (S1) Jurusan Teknik Kimia, akhirnya kami sampai ditahap akhir yaitu penyusunan skripsi ini dengan harapan kami semakin dapat mengupgrade diri melalui penelitian yang kami lakukan serta untuk memenuhi salah satu persyaratan kelulusan dari Tahap Sarjana Program Studi (S1) Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Selama melakukan penelitian dan penyusunan laporan skripsi ini, kami mendapat doa, bimbingan, dorongan, serta bantuan dari banyak pihak. Untuk itu, kami ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Tri Widjaja, M.Eng, Dosen Pembimbing sekaligus Kepala Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember atas bimbingan, kritik dan saran yang telah diberikan.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Widjaja, M.Eng. selaku Kepala Laboratorium Teknologi Biokimia Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
3. Bapak dan Ibu Dosen pengajar serta seluruh karyawan Jurusan Teknik Kimia yang telah memberikan ilmunya kepada penulis.
4. Seluruh civitas akademika Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS yang telah memberikan dukungan moril kepada penulis
5. Orang tua serta saudara-saudara kami, atas doa, bimbingan, perhatian, dan kasih sayang yang selalu tercurah tanpa batas selama ini.



6. Keluarga besar Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS), teman-teman di Laboratorium Biokimia Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS, khususnya teman-teman LJ Ganjil 2013 atas semua dukungan, semangat, serta kerjasamanya.

Kami menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan laporan ini, yang membutuhkan saran dan kritik yang konstruktif demi kesempurnaan skripsi ini.

Surabaya , Juni 2015

Penyusun

# DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	
LEMBAR PENGESAHAN	
ABSTRAK .....	ii
ABSTRACT .....	iv
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI .....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
BAB I    PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang .....	1
I.2 Rumusan Masalah .....	3
I.3 Batasan Masalah .....	3
I.4 Tujuan Penelitian .....	4
I.5 Manfaat Penelitian .....	4
BAB II   TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Limbah Kulit Kopi .....	5
II.2 Gula Reduksi .....	7
II.3 Lignoselulosa .....	8
II.4 Proses Pretreatment Bahan Berlignoselulosa ..	11
II.5 Enzim .....	14
II.6 Mikroorganisme .....	18
II.7 Hidrolisis .....	25
II.8 Fermentasi .....	27
II.9 Media Fermentasi .....	28
II.10 Penelitian Terdahulu .....	29
BAB III   METODE PENELITIAN	
III.1 Variabel Eksperimen .....	33
III.2 Kondisi Operasi Penelitian .....	33
III.3 Dimensi Alat .....	34
III.4 Bahan yang Digunakan .....	34
III.5 Metode Eksperimen .....	35
III.6 Set Up Peralatan Penelitian .....	49
III.7 Diagram Alir .....	50

III.8 Rencana Jadwal Kegiatan Penelitian .....	63
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	
IV.1 <i>Pretreatment</i> Kulit Buah Kopi.....	66
IV.1.1 <i>Pretreatment</i> Mekanik .....	66
IV.1.2 <i>Pretreatment</i> Kimiawi .....	66
IV.1.2.1 <i>Pretreatment</i> Kulit Buah Kopi dengan Metode Organoslv .....	67
IV.2 Produksi Crude Enzim Selulase dan Crude Enzim Xilanase dari <i>Aspergillus Niger</i> dan <i>Trichoderma Ressei</i> .....	71
IV.2.1 Penyiapan dan Pembuatan Larutan Enzim <i>Selulase</i> dan <i>Xilanase</i> Murni ..	72
IV.2.2 Penyiapan dan Pembuatan <i>Crude</i> <i>Enzyme</i> dari <i>Trichoderma Ressei</i> dan <i>Aspergillus Niger</i> .....	76
IV.3 Hidrolisis Kulit Buah Kopi .....	77
IV.3.1 Hidrolisis Kulit Buah Kopi dengan Campuran Enzim Murni.....	77
IV.3.2 Hidrolisis Kulit Buah Kopi dengan Campuran <i>Crude</i> Enzim.....	83
IV.4 Fermentasi Hidrolisat Kulit Kopi menjadi Etanol .....	90
IV.4.1 Analisa JumlahSel .....	90
IV.4.2 Pengaruh Jenis Mikroorganisme terhadap Performa Fermentasi .....	93
IV.4.3 Fermentasi Kulit Kopi menjadi Etanol dengan <i>Z.mobilis</i> dan <i>S.sereviciae</i> .....	95
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
V.1 Kesimpulan .....	99
V.2 Saran .....	99
DAFTAR PUSTAKA .....	xii
DAFTAR NOTASI .....	xii
APPENDIKS	
LAMPIRAN	

## DAFTAR TABEL

Tabel II.1	Kandungan Kulit Kopi .....	7
Tabel II.2	Perbandingan <i>Pretreatment</i> Asam dan Basa .....	12
Tabel III.8	Rencana Jadwal Kegiatan Penelitian.....	63
Tabel IV.1	Komposisi Kimia Kulit Biji Kopi Tanpa <i>Pretreatment</i> .....	67
Tabel IV.2	Perubahan Massa Akhir Kulit Biji Kopi Setelah <i>Pretreatment</i> secara Kimiawi dengan Metode <i>Organosolv</i> .....	68
Tabel IV.3	Komposisi Kimia Sebelum dan Setelah <i>Pretreatment</i> Metode <i>Organosolv</i> .....	70
Tabel IV.4	Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Keaktifan Enzim Selulase .....	72
Tabel IV.5	Perhitungan Kurva Standar Xilosa (dengan Xylan) untuk Keaktifan Enzim Xilanase .....	73
Tabel IV.6	Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dan Enzim Xilanase .....	75
Tabel IV.7	Kebutuhan Enzim <i>Crude</i> untuk Hidrolisis .....	77
Tabel IV.8	Perhitungan Kurva Standar Glukosa untuk Konsentrasi Gula Reduksi .....	78
Tabel IV.9	Data Analisa Gula Reduksi oleh Campuran Enzim Murni .....	81
Tabel IV.10	Data Analisa Gula Reduksi oleh Campuran Enzim <i>Crude</i> .....	85
Tabel IV.11	Yield Hasil Hidrolisis Berbagai Konsentrasi <i>Pretreatment</i> .....	89
Tabel IV.12	Perbandingan Kadar Etanol untuk Tiap Mikroorganisme .....	97

## DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1	Kulit daging buah kopi .....	6
Gambar II.2	Macam-macam gula reduksi.....	8
Gambar II.3	Struktur bangun selulosa dan ikatan $\beta$ -1,4 serta gugus pereduksi yang dimilikinya. ....	9
Gambar II.4	Struktur polimer hemiselulosa.....	10
Gambar II.5	Struktur polimer lignin .....	11
Gambar II.6	Skema Proses Pretreatment .....	13
Gambar II.7	Struktur polimer xilan dan pemotongannya oleh aktifitas enzim xilanase.....	17
Gambar II.8	<i>Trichoderma reesei</i> .....	19
Gambar II.9	<i>Aspergillus niger</i> .....	21
Gambar II.10	<i>Zymomonas mobilis</i> .....	23
Gambar II.11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
Gambar II.12	Pathway Etanol.....	28
Gambar III.1	<i>Haemacytometer</i> Neubauer .....	47
Gambar III.2	Set-up Peralatan <i>Pretreatment</i> .....	49
Gambar III.3	Set-up Peralatan Hidrolisis .....	49
Gambar III.4	Set-up Peralatan Fermentasi <i>Batch</i> .....	50
Gambar IV.1	Kurva Standar Glukosa untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase.....	73
Gambar IV.2	Kurva Standar Xilosa untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase .....	74
Gambar IV.3	Kurva Standar Glukosa untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi .....	78
Gambar IV.4	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi dengan Enzim Murni pada Jam Ke .....	82
Gambar IV.5	Kurva Konsentrasi Gula Reduksi dengan Enzim <i>Crude</i> pada Jam Ke .....	86
Gambar IV.6	Grafik Pertumbuhan <i>Zymomonas mobilis</i> Termutasi A3 .....	91
Gambar IV.7	Grafik Pertumbuhan <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> .....	92
Gambar IV.8	Grafik Gula Reduksi pada Fermentasi	

	<i>Zymomonas mobilis</i> Termutasi A3 .....	94
GambarIV.9	Grafik Gula Reduksi pada Fermentasi	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	95

## DAFTAR NOTASI

No	Notasi	Keterangan	Satuan
1	BM	Berat Molekul	g/mol
2	A1	Absorbansi larutan sebelum koreksi	nm
3	A2	Absorbansi larutan koreksi	nm
4	A	Absorbansi larutan setelah koreksi	nm
5	V	Volume	ml
6	$\rho$	Massa jenis/densitas	g/mL
7	S : X	Enzim selulase : enzim xilanase	-
8	T : A	T. ressei : A. niger	-
9	U	Kebutuhan enzim	U
10	N	Normalitas	N
11	% wt	% berat	% wt
12	M	Molaritas	Mol/L

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1. Latar Belakang**

Kebutuhan energi Indonesia saat ini sebagian besar masih bertumpu pada bahan bakar fosil. Kebutuhan energi nasional ditopang minyak bumi sekitar 51,66 persen, gas alam 28,57 persen dan batubara 15,34 persen. Persediaan bahan bakar tersebut kian waktu semakin berkurang. Cadangan minyak bumi akan habis sekitar 12 tahun lagi, gas 30 tahun dan batu bara masih bisa dimanfaatkan hingga 70 tahun ke depan. Ketergantungan terhadap bahan bakar fosil ini menjadi masalah besar dan perlu solusi yang mendesak. Salah satu langkah solusinya adalah memanfaatkan bioetanol lignoselulosa sebagai alternatif pengganti. Untuk mengurangi ketergantungan pada bahan bakar fosil, pemerintah mengeluarkan Peraturan Presiden (Perpres) No.5 Tahun 2006 tentang kebijakan energi nasional untuk mendorong pengembangan sumber energi alternatif sebagai pengganti bahan bakar minyak.

Salah satu sumber biomasa lignoselulosa non pangan di Indonesia yang tersedia melimpah adalah limbah kulit kopi. Areal perkebunan kopi rakyat di Indonesia tahun 2012 luas areal kopi mencapai 1.354.000 ha dengan nilai produktivitas 743 kg/ha. Hasil produksi kopi tersebut langsung diolah menjadi produk utama bubuk kopi. Dalam proses pengolahan biji kopi menjadi bubuk kopi tersebut, menghasilkan limbah berupa limbah kulit kopi. Limbah kulit kopi tersebut belum dimanfaatkan secara baik dan optimal. Hal ini terlihat dari menumpuknya limbah kulit kopi di sekitar dan perkebunan rakyat dan tempat usaha penggilingan biji kopi yang ada di Indonesia.

Bioetanol ( $C_2H_5OH$ ) diperoleh melalui proses fermentasi gula sederhana / glukosa yang terdapat pada bahan alami (tumbuh-tumbuhan) dengan memanfaatkan kemampuan mikroorganisme tertentu. Bioetanol merupakan salah satu sumber energi baru yang memiliki kelebihan dibanding dengan Bahan

Bakar Minyak (BBM), diantaranya memiliki kandungan oksigen yang lebih tinggi (35%) sehingga terbakar lebih sempurna, nilai oktan lebih tinggi, dapat diproduksi oleh mikroorganisme secara terus menerus dan lebih ramah lingkungan karena emisi gas CO yang dihasilkan lebih rendah 19-25%. Menurut penelitian yang ada bahwa bioetanol dapat diproduksi dari proses fermentasi limbah kulit kopi.

Riset ini bertujuan untuk menghasilkan bioethanol dari kulit kopi dengan memanfaatkan komponen selulosa maupun hemiselulosanya. Limbah kulit kopi yang diperoleh mengandung selulosa 63%, hemiselulosa 2,3%, lignin 17%, protein 11,5%, tanin 1,8-8,56% dan pektin 6,5%. Namun, pada komposisi kimia kulit kopi mengandung kadar lignin cukup tinggi yang dapat mempengaruhi dalam hal pembentukan ikatan antar serat dan menghambat kerja enzim dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. (*Sugesty, 1986*). Oleh karena itu harus dilakukan pretreatment untuk menurunkan kadar lignin. Berdasarkan literature, metode organosolv mampu menghasilkan sejumlah besar lignin berkualitas tinggi yang relatif murni tetapi juga mampu melarutkan sebagian besar hemiselulosa. Selain itu, substrat dari pretreatment organosolv memiliki aktifitas enzimatik yang tinggi daripada metode alternatif lainnya (*L. Mesa, dkk 2010*). Untuk membuktikan bahwa proses *organosolv* efektif dalam menurunkan lignin, maka digunakan pretreatment pembanding dengan menggunakan metode alkali. Selulosa dan hemiselulosa yang dihasilkan dari pretreatment kimia kemudian dihidrolisis menggunakan enzim selulase murni dan enzim xilanase murni untuk menghidrolisis menjadi glukosa dan xilosa. Namun, dari segi ekonomi, harga enzim murni cukup mahal maka dari itu kami menggunakan crude enzim. Kemudian dilakukan fermentasi gula reduksi menjadi bioethanol menggunakan variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis* Latar belakang inilah yang mendasari pemilihan judul :

## **“ STUDI TEKNIK PRODUKSI ETANOL DARI LIMBAH KULIT BUAH KOPI (*Parchment hull / endocarp*) “**

### **I.2 Rumusan Masalah**

1. Perlu dipelajari energi alternatif pengganti energi berbasis fosil yang ramah lingkungan dan dapat dihasilkan dari bahan yang dapat diperbaharui dan harganya yang murah seperti limbah kulit kopi.
2. *Pretreatment* untuk menghilangkan lignin yang biasa digunakan adalah metode basa. Sedangkan berdasarkan literatur, metode *pretreatment* terbaik yaitu menggunakan metode *organosolv*.
3. Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan enzim selulase murni dan enzim xilanase murni. Namun, dari segi ekonomi, harga enzim murni cukup mahal maka dilakukan juga hidrolisis menggunakan *crude enzim*.
4. Banyaknya proses fermentasi bioetanol menggunakan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*. Sedangkan berdasarkan literatur, fermentasi gula reduksi menjadi bioethanol juga dapat menggunakan mikroorganisme *Zymomonas mobilis*.

### **I.3 Batasan Masalah**

Agar penelitian ini tidak menyimpang dari ketentuan yang digariskan maka diambil batasan dan asumsi sebagai berikut :

1. Bahan baku yang digunakan adalah lignoselulosa dari limbah kulit kopi.
2. *Pretreatment* limbah kulit kopi secara kimia metode *organosolv* dengan pembanding metode alkali.
3. Proses pembuatan bioetanol dengan hidrolisis enzimatis menggunakan campuran enzim selulase murni dengan enzim xilanase murni dan campuran *crude enzim* selulase dengan *crude enzim* xilanase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*.

4. Proses pembuatan bioetanol dengan fermentasi menggunakan variasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan *Zymomonas mobilis*.

#### **I.4 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah yang disampaikan di atas, maka tujuan penelitian adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui hasil *pretreatment* limbah kulit kopi dengan metode *organosolv* dan metode alkali.
2. Mengetahui hasil hidrolisis limbah kulit kopi dengan menggunakan campuran enzim selulase murni dengan enzim xilanase murni dan campuran crude enzim selulase dengan crude enzim xilanase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*.
3. Mengetahui hasil fermentasi bioetanol dari limbah kulit kopi dengan menggunakan variasi mikroorganisme *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **I.5 Manfaat Penelitian**

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengoptimalkan pemanfaatan limbah kulit kopi yang memiliki kadar selulosa yang cukup besar (63%) menjadi bioetanol.
2. Menerapkan metode *pretreatment* dengan menggunakan metode *organosolv*. Kemudian hasil *pretreatment* dilanjutkan dengan pembuatan bioetanol dengan hidrolisis menggunakan campuran enzim murni dan campuran crude enzim. Lalu difermentasi dengan menggunakan mikroorganisme *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Sebagai informasi bahwa proses pembuatan etanol dalam eksperimen ini menggunakan limbah kulit kopi.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1. Limbah Kulit Kopi**

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah kulit kopi. Menurut *Londra (2002)*, hasil pengolahan kopi akan menyisakan limbah, yaitu kulit buah dan kulit biji. Limbah kopi dibedakan menjadi dua macam, yaitu limbah pada pengolahan kopi merah (masak) dan limbah pengolahan kopi hijau (mentah). Pengolahan kopi merah diawali dengan pencucian, perendaman, dan pengupasan kulit luar. Proses ini akan menghasilkan 65 persen biji kopi dan 35 persen limbah kulit kopi. Limbah kulit kopi selama ini tidak mengalami pemrosesan di pabrik karena yang digunakan hanya biji kopi yang kemudian dijadikan bubuk kopi instan.

Pengolahan kopi secara basah akan menghasilkan limbah padat berupa kulit buah pada proses pengupasan buah (*pulping*) dan kulit tanduk pada saat penggerbusan (*hulling*). Limbah padat kulit buah kopi (*pulp*) belum dimanfaatkan secara optimal, umumnya ditumpuk di sekitar lokasi pengolahan selama beberapa bulan, sehingga timbulnya bau busuk dan cairan yang mencemari lingkungan. Limbah kulit buah kopi memiliki kadar bahan organik dan unsur hara yang memungkinkan untuk memperbaiki tanah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar C-organik kulit buah kopi adalah 45,3 %, kadar nitrogen 2,98 %, fosfor 0,18 % dan kalium 2,26 %. Selain itu kulit buah kopi juga mengandung unsur Ca, Mg, Mn, Fe, Cu dan Zn. Dalam 1 ha areal pertanaman kopi akan memproduksi limbah segar sekitar 1,8 ton setara dengan produksi tepung limbah 630 kg (*Dirjen Perkebunan, 2008*).

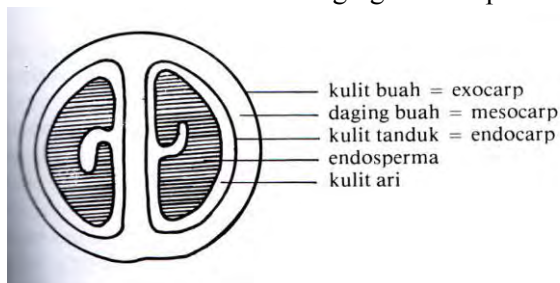
Limbah kulit kopi yang diperoleh dari proses pengolahan kopi dari biji utuh menjadi kopi bubuk. Proses pengolahan kopi ada 2 macam, yaitu (1) Pengolahan kopi merah/masak dan (2) Pengolahan kopi hijau/mentah. Pengolahan kopi merah diawali

dengan pencucian dan perendaman serta pengupasan kulit luar, proses ini menghasilkan 65% biji kopi dan 35% limbah kulit kopi. Limbah kopi sebagian besar dimanfaatkan sebagai pupuk pada tanaman kopi dan tanaman disekitarnya, sebagian kecil digunakan sebagai media budidaya jamur serta dimanfaatkan sebagai bahan jamu tradisional. Biji kopi kemudian dikeringkan dengan oven dan hasilnya adalah biji kopi kering oven sebanyak 31%, kemudian kopi ini digiling dan menghasilkan 21% beras kopi (kopi bubuk) dan 10% berupa limbah kulit dalam. Limbah yang dihasilkan dari proses ini (kulit dalam) pada umumnya dimanfaatkan sebagai pupuk, namun sebagian diantaranya dimanfaatkan oleh pengrajin jamu tradisional sebagai bahan jamu (Muryanto dkk, 2004).

### **Kulit Daging Buah Kopi**

Kulit kopi terdiri dari 3 (tiga) bagian, yaitu : 1). Lapisan bagian luar tipis yakni yang disebut "Exocarp"; lapisan ini kalau sudah masak berwarna merah. 2). Lapisan Daging buah; daging buah ini mengandung serabut yang bila sudah masak berlendir dan rasanya manis, maka sering disukai binatang kera atau musang. Daging buah ini disebut "Mesocarp". 3). Lapisan Kulit tanduk atau kulit dalam; kulit tanduk ini merupakan lapisan tanduk yang menjadi batas kulit dan biji yang keadaannya agak keras. Kulit ini disebut "Endocarp".

**Gambar II.1** kulit daging buah kopi



(AAK, 1988).

Kulit buah kopi merupakan limbah dari pengolahan buah kopi untuk mendapatkan biji kopi yang selanjutnya digiling menjadi bubuk kopi. Kandungan zat makanan kulit buah kopi dipengaruhi oleh metode pengolahannya apakah secara basah atau kering seperti terlihat pada tabel II.1. Kandungan zat makanan kulit buah kopi berdasarkan metode pengolahan. Pada metode pengolahan basah, buah kopi ditempatkan pada tanki mesin pengupas lalu disiram dengan air, mesin pengupas bekerja memisahkan biji dari kulit buah. Sedangkan pengolahan kering lebih sederhana, biasanya buah kopi dibiarkan mengering pada batangnya sebelum dipanen. Selanjutnya langsung dipisahkan biji dan kulit buah kopi dengan menggunakan mesin.

**Tabel II.1** Kandungan Kulit Kopi

No	Kandungan	Prosentase (%)
1	Selulosa	63
2	Hemiselulosa	2,3
3	Lignin	17
4	Protein	11,5
5	Tanin	1,8-8,56
6	Pektin	6,5

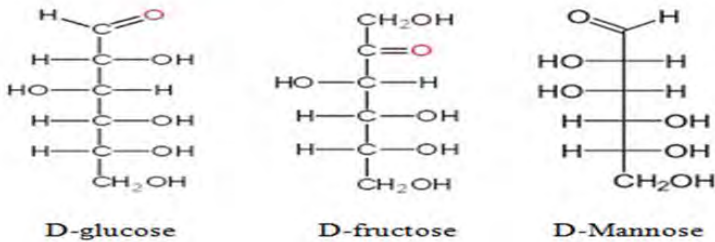
(Grisel Corro,dkk, 2013)

## II.2 Gula Reduksi

Gula reduksi adalah gula yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Hal ini dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas. Contoh gula yang termasuk gula reduksi adalah glukosa, manosa, fruktosa, laktosa, maltosa dan lain-lain. Sedangkan yang termasuk dalam gula non reduksi adalah sukrosa. Umumnya gula pereduksi yang dihasilkan berhubungan erat dengan aktifitas enzim, dimana semakin tinggi aktifitas enzim maka semakin tinggi pula gula pereduksi yang dihasilkan. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan selama reaksi diukur dengan menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat / *dinitrosalicylic acid* (DNS) pada panjang gelombang 540 nm.

Semakin tinggi nilai absorbansi yang dihasilkan, semakin banyak pula gula pereduksi yang terkandung.

**Gambar II.2** Macam-macam gula reduksi



## II.3 Lignoselulosa

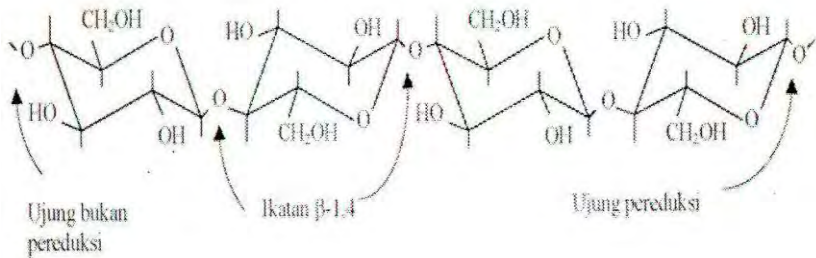
### A. Selulosa

Selulosa adalah homopolisakarida yang tersusun atas satuan-satuan anhidroglukopiranosa yang berikatan dengan ikatan glikosida-b-(1,4) membentuk rantai molekul linier glukana. Selulosa secara empiris dapat ditulis sebagai  $(C_6H_{10}O_5)_n$  dengan  $n$  adalah derajat polimerisasinya yang menyatakan jumlah satuan glukosa yang berikatan, ditunjukkan pada Gambar II.2. Derajat polimerisasi selulosa tumbuhan berada pada kisaran 305-15300 (Widjaja, 2009).

Selulosa berfungsi sebagai penguat pada batang tumbuhan, lignin untuk melindungi selulosa dari aksi kimiawi maupun biologis sedangkan hemiselulosa pengikat selulosa dengan lignin (Lee, 1992). Selulosa berupa polimer glukosa linier hidrofilik yang dihubungkan oleh ikatan glikosida. Banyaknya satuan glukosa dapat bervariasi antara 15 sampai lebih dari 10.000 per molekul selulosa. Polimer selulosa terdiri dari bagian kristalin dan amorf. Bagian amorf mudah dihidrolisis sedangkan bagian kristalin tidak mudah dihidrolisis baik secara kimiawi maupun enzimatik (Dahot dan Noomrio, 1996).



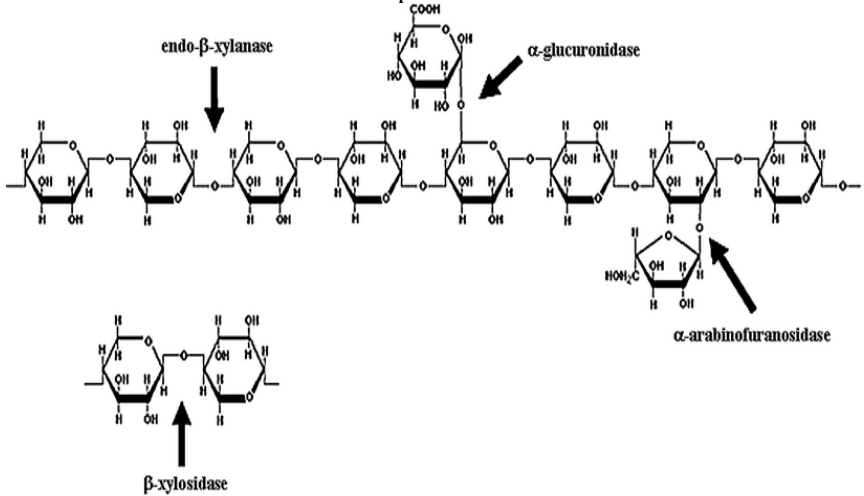
**Gambar II.3** Struktur bangun selulosa dan ikatan  $\beta$ -1,4 serta gugus pereduksi yang dimilikinya.



### B. Hemiselulosa

Hemiselulosa adalah gabungan dari polimer-polimer dengan rantai relatif lebih pendek dan bercabang, yang terdiri dari monomer xylosa, arabinosa, glukosa, manosa dan galaktosa, dengan struktur amorf (*Bailey dan Ollis, 1986*). Struktur polimer hemiselulosa ditunjukkan pada gambar II.3. Hemiselulosa berfungsi mendukung dalam dinding-dinding sel dan sebagai perekat. Dengan derajat polimerisasi hanya 200, maka hemiselulosa akan terdegradasi lebih dahulu daripada selulosa (*Widjaja, 2009*). Komponen utama dari hemiselulosa pada dinding sel tumbuhan yaitu xilan, yang terikat pada selulosa, pektin, lignin dan polisakarida lainnya untuk membentuk dinding sel. Jumlah xilan di alam sangat besar dimana merupakan jumlah terbesar kedua setelah selulosa (*Subramariyan dan Prime, 2002*).

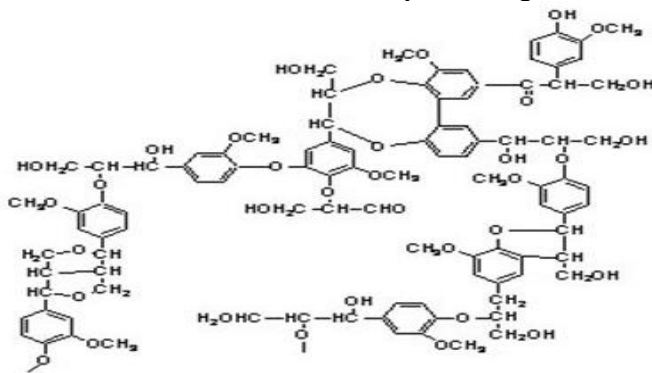
**Gambar II.4** Struktur polimer hemiselulosa



### C. Lignin

Selain selulosa dan hemiselulosa, ada komponen lain yaitu lignin, yang berfungsi untuk melindungi hemiselulosa dan selulosa dari aksi kimiawi (Lee, 1992). Struktur polimer lignin ditunjukkan pada gambar II.4. Meskipun dilindungi oleh lignin, jerami padi masih dapat dihidrolisis menjadi glukosa oleh mikroorganisma selulotik seperti *Trichoderma reesei* (Muthuvelayudham dan Viruthagiri, 2006) maupun *Aspergillus niger* (Aderemi dkk., 2008).

**Gambar II.5** Struktur polimer lignin



Hidrolisis selulosa secara biologik dapat dilakukan baik menggunakan enzim *selulase* (Vrije dkk., 2002; Raghavendra dkk., 2007) maupun mikroorganisme penghasil selulase (Aderemi dkk., 2008). Hidrolisis selulosa dipengaruhi oleh jenis sumber substrat (seperti serbuk gergaji, jerami padi, sabut sawit) dan ukuran partikel. Jerami padi lebih sulit dihidrolisis dibandingkan dengan serbuk gergaji maupun sabut sawit (Dewi, 2002).

#### **II.4 Proses Pretreatment Bahan Berlignoselulosa**

Lignoselulosa merupakan senyawa gabungan dari selulosa, hemiselulosa, dan lignin. *Pretreatment* suatu biomassa biasanya dibutuhkan pada suatu proses operasi untuk mendapatkan glukosa dengan *yield* yang tinggi. Pada umumnya, prosedur *pretreatment* meliputi *pretreatment* fisika atau mekanik seperti penggilingan, *pretreatment* secara kimia seperti asam kuat atau basa kuat, serta *thermal pretreatment* menggunakan ledakan steam. Menurut Hendriks dan Zeeman (2008), ada beberapa tipe klasifikasi *pretreatment* yaitu : *pretreatment* mekanik, *pretreatment thermal*, *pretreatment* asam, *pretreatment* alkali,

*pretreatment oksidative*, kombinasi *pretreatment ammonia* dan karbondioksida. *Pretreatment steam*, *pretreatment kapur*, *pretreatment air panas* dan *pretreatment ammonia* dasar merupakan *pretreatment* dengan potensial tinggi sehingga efek utama yang terjadi adalah pelarutan hemiselulosa dan perusakan struktur lignin, yang bertujuan untuk meningkatkan pencapaian selulosa untuk hidrolisis enzim.

#### **II.4.1 Pretreatment Asam**

Pada proses ini hemiselulosa terhidrolisis menjadi gula monomer yang mana akan ter-recover di fraksi liquid setelah filtrasi. Hasil residu yang berupa padatan akan mengandung selulosa dan ligin yang akan digunakan lebih lanjut untuk proses hidrolisa menggunakan selulosa (Taherzadeh and Karimi,2008). Proses *pretreatment* ini menghasilkan produk samping seperti furtural (hasil samping gula pentose) dan hydroxyl methyl furfural (HMF; hasil samping gula hexose), phenolic acid (hasil samping lignin) dan acetate (diacetylation produk dari hemicellulose). Masing-masing dari produk samping ini pada konsentrasi kurang lebih 5 mM telah menunjukkan efek penghambatan yang cukup signifikan pada proses fermentasi. Dengan menggunakan konsentrasi asam yang tinggi dan temperatur yang tinggi maka didapat konsentrasi gula reduksi yang tinggi, namun dalam kondisi itu gula reduksi tergradasi pada tingkat yang lebih lanjut.

**Tabel II.2.** Perbandingan *Pretreatment Asam* dan Basa

<b>Asam</b>	<b>Basa</b>
Menurunkan lignin secara signifikan	Tidak menurunkan lignin secara signifikan
Membutuhkan energi yang besar karena membutuhkan temperatur yang tinggi (100-230 °C)	Berjalan pada temperatur rendah (60-100 °C)
Penurunan kadar hemiselulosa lebih tinggi dibandingkan lignin	Penurunan kadar lignin lebih tinggi dibandingkan

	hemiselulosa
Menghasilkan produk samping berupa asam asetat dan furfural	Tidak menghasilkan produk samping
Menyebabkan korosif dan limbah yang toksik	Lebih ramah lingkungan

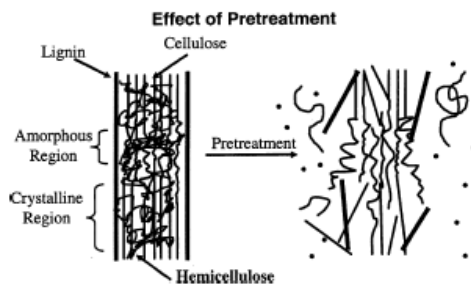
(Lee S dan Mussato, 2007; Rocha dan Rabelo, 2011)

#### II.4.2 Pretreatment Alkali

*Pretreatment* menggunakan alkali adalah proses *pretreatment* yang paling umum digunakan dengan menggunakan NaOH dan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Proses ini menghasilkan penghapusan semua lignin dan bagian dari hemiselulosa, dan peningkatan *reactivity* dari selulosa.

Penghilangan lignin efektif meminimalkan adsorpsi dari enzim ke lignin dan dengan demikian dapat membebaskan selulosa. *Pretreatment* dengan menggunakan NaOH meningkatkan kadar selulosa yang didapat hingga 55 % sementara penurunan lignin antara 20 sampai 25 %.

**Gambar II.6.** Skema Proses *Pretreatment*



(Sumber : Mosier dkk., 2005)

#### II.4.3 Organosolv

*Pretreatment organosolv* adalah proses pemisahan serat dengan menggunakan pelarut organik dengan atau tanpa katalis asam/basa, yang mengambil peran untuk menghidrolisis lignin dalam biomassa (Hamid Amiri, 2014). *Pretreatment* ini dapat meningkatkan kandungan selulosa serta efektif dalam degradasi

hemiselulosa/lignin dan mengurangi kristalinitas. Semakin besar konsentrasi pelarut maka semakin besar pula penurunan lignin dan juga melarutkan sebagian kecil hemiselulosa serta menaikkan selulosa. Pretreatment organosolv dilakukan pada suhu 100-250°C dengan adanya katalis asam. Namun dengan adanya penambahan asam, suhu tinggi menyebabkan dekomposisi xilosa menghasilkan senyawa yang dapat menghambat seperti furfural, hydroxylemthyl furfural dan polifenol. Kelemahan lain dari pretreatment organosolv membutuhkan pelarut yang banyak dan konsumsi energi recovery pelarut sangat besar. Etanol digunakan sebagai pelarut karena untuk biaya rendah (*Anli Geng, 2012*). Dibandingkan dengan pretreatment kimia lainnya, salah satu keuntungan utama dan unik proses organosolv adalah penurunan lignin sebagai produk yg berharga, yang relatif murni, dan energi yg dibutuhkan minimal. Dari sudut lingkungan, pemisahan lignin sebagai produk bisa mengurangi masalah dengan pengolahan air limbah. peningkatan selulosa oleh penghapusan sebagian dari lignin adalah bentuk peningkatan konsentrasi glukosa diperoleh maksimal (*Hamid Amiri, 2014*).

## **II.5 Enzim**

Enzim adalah biokatalis yang diproduksi oleh jaringan makhluk hidup, yang berfungsi untuk mengkatalisa reaksi-reaksi yang terjadi dalam jaringan. Apabila tidak terdapat enzim maka reaksi-reaksi akan berjalan terlalu lambat untuk menopang kehidupan jaringan atau reaksi-reaksi tersebut akan memerlukan kondisi-kondisi non fisiologis (*Montgomery dkk., 1999*). Enzim mempunyai spesifikasi tinggi karena dapat bekerja dengan kecepatan perubahan besar dan pada keadaan fisiologis yang lunak, yaitu pada tekanan dan suhu rendah serta dalam larutan air.

Untuk menghasilkan enzim diperlukan bantuan mikroorganisme. Semua mikroorganisme memerlukan media yang mengandung sumber karbon untuk pertumbuhannya.

Mikroorganisme penghasil xilanase memerlukan xilan sebagai sumber karbon. Yang akan diaplikasikan dalam proses degradasi xilan menjadi xilosa. Untuk menghasilkan enzim xilanase dengan aktifitas tinggi perlu dilakukan pemilihan strain yaitu:

#### 1. Seleksi strain

Dalam memproduksi enzim dari mikroorganisme, hal yang penting untuk dikerjakan adalah mulai menggunakan strain mikroorganisme yang paling aktif yang tersedia. Suatu program seleksi strain harus dilakukan dengan mengambil kultur dari alam atau koleksi kultur, dan melakukan pengujian-pengujian aktivitas enzim. Persyaratan utama dalam seleksi adalah kemudahan metodologi, sehingga pengujian yang cepat untuk sejumlah besar strain dapat dikerjakan.

#### 2. Perbaikan kondisi pembentukan enzim

Bilamana sebuah strain mikroorganisme yang baik telah diperoleh, parameter-parameter harus diatur sampai titik optimal untuk memaksimalkan pertumbuhan dan produksi enzim. Diantara parameter yang penting adalah suhu, pH dan transfer oksigen. Hal penting lainnya adalah nutrien untuk mikroorganisme, khususnya senyawa-senyawa yang mengandung karbon, nitrogen, fosfor, sulfur dan garam-garam mineral.

Jenis mikroorganisme yang sudah umum menghasilkan xilanase ialah dari golongan jamur dan bakteri. Adapun jenis jamur yang berpotensi menghasilkan enzim xilanase yaitu jamur *Trichoderma reesei*.

*Trichoderma* adalah suatu jamur filamen yang secara luas berada di dalam tanah, tumbuh-tumbuhan yang membusuk, dan kayu. Walaupun biasanya dianggap sebagai suatu zat-pencemar, *Trichoderma* bisa menyebabkan infeksi/peradangan di dalam kehadiran faktor keterpengaruh tertentu. Merupakan jamur mesofilic yang tumbuh pada 25°C - 37°C, pH : 4-7 dan aerob (Ahamed, A. P. Vermette. 2008.)

## Enzim xilanase

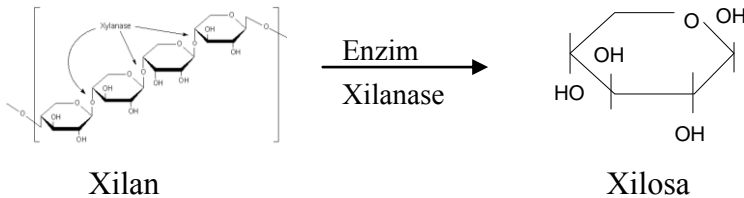
Enzim xilanase merupakan biokatalis reaksi hidrolisis xilan (hemiselulosa) menjadi gula reduksi. Enzim xilanase dapat dihasilkan oleh sejumlah mikroorganisme seperti: *A. niger*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Penicillium*, *Aureo-basidium*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Humicola*.

Xilanase merupakan kelompok enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa, dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilo-oligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase.  $\beta$ -xilosidase, yaitu xilanase yang mampu menghidrolisis xilo-oligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Aktivitas enzim akan menurun dengan meningkatnya rantai xilo-oligosakarida (*Dekker and Richards, 1976*). Xilosa selain merupakan hasil hidrolisis juga merupakan inhibitor bagi enzim  $\beta$ -xilosidase.

Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek. Xilosa diklasifikasikan sebagai monosakarida tipe aldopentosa yang memiliki lima atom carbon dan satu gugus. Fraksi hemiselulosa dapat dihidrolisa dengan mudah oleh asam. Jika sellulosa dan hemiselulosa dimanfaatkan dalam proses hidrolisis secara efisien, hemiselulosa akan terhidrolisa secara komplit menjadi D-xilosa (50 – 70 % w/w) dan L-arabinosa (5 – 15 % w/w), dan sellulosa akan dikonversi menjadi glucose (*Ladish, 1989; Cao et al 1995; Puls & Schuseil, 1993*). Struktur molekul xilan dan pemotongannya ditunjukkan pada gambar II.5, dimana dari degradasi ini akan dihasilkan produk monomer gula D-xilosa dengan 5 atom karbon.



**Gambar II.7** Struktur polimer xilan dan pemotongannya oleh aktifitas enzim xilanase



Enzim xilanase dapat mengandung sedikit aktifitas transferase sehingga potensial dalam industri penghasil xilosa. Eksoxilanase dapat ditingkatkan aktifitasnya dengan menambahkan induser xilan pada produksinya (Ratanahanokchai, 1994). Endoxilanase mampu memutus ikatan  $\beta$  1-4 pada bagian dalam rantai xilan secara teratur. Ikatan yang diputus ditentukan berdasarkan panjang rantai substrat, derajat percabangan, ada atau tidaknya gugus substitusi dan pola pemutusan dari enzim hidrolase tersebut (Richana, 2002).

### Enzim Selulase

Enzim selulase merupakan enzim yang menyerang ikatan glikosida dengan menghidrolisa selulosa menjadi glukosa. Enzim selulase yang di produksi oleh mikroorganisme merupakan enzim yang di induksi dan hanya diproduksi jika mikroorganisme tumbuh pada substrat selulosa dan glukosa lain dengan ikatan  $\beta$ -1,4, seperti selobiosa. Tingginya aktifitas enzim selulase dilihat dari aktifitas selulase yang dihidrolisa ikatan  $\beta$ -1,4-glikosida pada ujung-ujung non pereduksi rantai selulosa kristalin. Enzim selulase adalah enzim yang dibutuhkan untuk proses hidrolisa enzimatik pada selulosa. Enzim ini merupakan suatu campuran kompleks yang terdiri dari tiga enzim yaitu :

1. Endo- $\beta$ -1,4-glukanase  
Endo- $\beta$ -1,4-glukanase adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 5300-145000. Enzim ini menyerang rantai bagian dalam dari selulosa amorphous menghasilkan selodextrin, sellobiosa, atau glukosa. Enzim ini tidak dapat menghidrolisa selulosa Kristal secara sendirian, tetapi ketika bersamaan dengan Exo- $\beta$ -1,4-glukanase enzim ini dapat mendegradasi selulosa Kristal secara intensif.
2. Exo- $\beta$ -1,4-glukanase  
Exo- $\beta$ -1,4-glukanase adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 42000-65000. Ada dua jenis yaitu Exo- $\beta$ -1,4-cellobiohidrolase dan Exo- $\beta$ -1,4-glukan glukohidrolase. Enzim ini menyerang *Crystalline Cellulose*. Kerja enzim ini dihambat dengan adanya produk yaitu selobiosa atau glukosa.
3.  $\beta$ -1,4-glukosidase  
 $\beta$ -1,4-glukosidase atau selobiosa adalah *glycoprotein* dengan berat molekul 50000-410000.  
Enzim ini dapat menghidrolisa selobiosa menjadi glukosa dan juga dapat mendegradasi seloligosakarida. Kerja enzim ini di hambat oleh produk reaksi yaitu glukosa

## **II.6 Mikroorganisme**

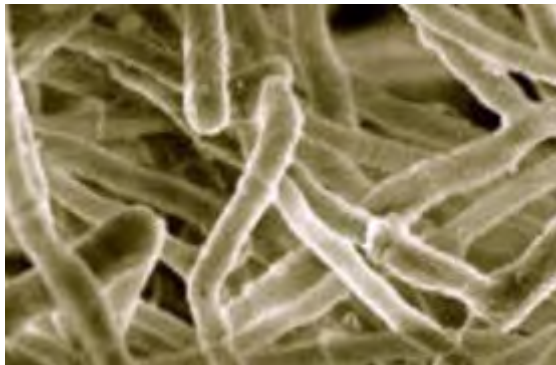
### ***Trichoderma reesei***

#### **a. Morfologi**

*Trichoderma reesei* merupakan kelompok jamur tanah sebagai penghasil selulase yang paling efisien (Davidek *et al.*, 1990). Keuntungan jamur tersebut sebagai sumber selulase adalah menghasilkan selulase lengkap dengan semua komponen-komponen yang dibutuhkan untuk hidrolisis total selulosa kristal dan protein selulosa yang dihasilkan cukup tinggi. *Trichoderma reesei* merupakan jamur mesofilik dan berfilamen. Jamur tersebut merupakan anamorp dari jamur *Hypocrea jecorina*. *Trichoderma reesei* memiliki kapasitas yang besar sebagai penghasil enzim cellulolytic (selulosa dan hemiselulosa). Mikrobial selulosa yang

dimiliki dapat diaplikasikan dalam bidang industry untuk mengubah selulosa dari gabungan komponen biomassa tanaman menjadi glukosa. Berdasarkan penemuan baru di bidang biokimia dari enzimologi selulosa, mekanisme untuk menghidrolisis sellulosa adalah dengan cara memperbaharui strain, molecular cloning dan proses engineering. Beberapa industry menggunakan strain yang memiliki karakter tertentu. contoh: Rut-C30<sup>[3]</sup>, RL-P37 dan MCG-80 merupakan genom dari organism tersebut yang dirilis pada tahun 2008.

**Gambar II.8** *Trichoderma reesei*



**b. Habitat**

*Trichoderma* spp. dapat ditemui di hampir semua jenis tanah dan pada berbagai habitat. Jamur ini dapat berkembang biak dengan cepat pada daerah perakaran. Di samping itu *Trichoderma* spp. merupakan jamur parasit yang dapat menyerang dan mengambil nutrisi dari jamur lain. Peranan *Trichoderma* spp. yang mampu menyerang jamur lain namun sekaligus berkembang baik pada daerah perakaran menjadikan keberadaan jamur ini dapat berperan sebagai *biocontrol* dan memperbaiki pertumbuhan tanaman.

**c. Kegunaan**

*Trichoderma* adalah jamur penghuni tanah yang dapat diisolasi dari perakaran tanaman lapangan. Spesies *Trichoderma*

disamping sebagai organisme pengurai, dapat pula berfungsi sebagai agen hayati dan stimulator pertumbuhan tanaman. Saat ini, *Trichoderma* merupakan salah satu mikroorganisme fungsional yang dikenal luas sebagai pupuk biologis tanah. Menurut Ramada (2008) menyatakan bahwa pupuk biologis *Trichoderma* dapat dibuat dengan inokulasi biakan murni pada media aplikatif, misalnya dedak. Sedangkan biakan murni dapat dibuat melalui isolasi dari perakaran tanaman, serta dapat diperbanyak dan diremajakan kembali pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*).

*Trichoderma* sering kali menjadi masalah tertentu di dalam industri penanaman jamur, di mana *Trichoderma* dapat menjadi parasit pada miselium dan badan buah dari jamur lain. Ketika jamur lain menjadi inang parasit *Trichoderma*, kemudian berkembang sangat cepat di permukaan membentuk koloni yang berwarna hijau, sehingga membuat jamur menjadi buruk dan mengubah bentuk jamur lain (Volk, 2004).

### ***Aspergillus niger***

#### **a. Morfologi**

*Aspergillus niger* merupakan fungi dari filum ascomycetes yang berfilamen, mempunyai hifa bersepat, dan dapat ditemukan melimpah di alam. Fungi ini biasanya diisolasi dari tanah, sisa tumbuhan, dan udara di dalam ruangan. Koloninya berwarna putih pada *Agar Dekstrosa Kentang* (PDA) 25 °C dan berubah menjadi hitam ketika konidia dibentuk. Kepala konidia dari *Aspergillus niger* berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar seiring dengan bertambahnya umur.

**Gambar II.9** *Aspergillus niger*



**b. Habitat**

*Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, dengan suhu minimum 6-8 °C, dan suhu maksimum 45-47 °C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (*aerobik*). *Aspergillus niger* memiliki warna dasar berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat gelap sampai hitam.

**c. Metabolisme**

Dalam metabolismenya *Aspergillus niger* dapat menghasilkan asam sitrat sehingga fungi ini banyak digunakan sebagai model fermentasi karena fungi ini tidak menghasilkan mikotoksin sehingga tidak membahayakan. *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan cepat, oleh karena itu *Aspergillus niger* banyak digunakan secara komersial dalam produksi asam sitrat, asam glukonat, dan pembuatan berupa enzim seperti amilase, pektinase, amiloglukosidase, dan selulase.

Selain itu, *Aspergillus niger* juga menghasilkan *gallic acid* yang merupakan senyawa fenolik yang biasa digunakan dalam industri farmasi dan juga dapat menjadi substrat untuk memproduksi senyawa antioksidan dalam industri makanan..

*Aspergillus niger* dalam pertumbuhannya berhubungan langsung dengan zat makanan yang terdapat dalam substrat, molekul sederhana yang terdapat disekeliling hifa dapat langsung diserap sedangkan molekul yang lebih kompleks harus dipecah dahulu sebelum diserap ke dalam sel, dengan menghasilkan beberapa enzim ekstra seluler seperti protease, amilase, mananase, dan  $\alpha$ -glaktosidase. Bahan organik dari substrat digunakan oleh *Aspergillus niger* untuk aktivitas transport molekul, pemeliharaan struktur sel, dan mobilitas sel.

#### **d. Kegunaan**

*Aspergillus niger* yang dibiakkan untuk produksi industri banyak zat. Berbagai strain *Aspergillus niger* yang digunakan dalam penyiapan industri asam sitrat (E330) dan asam glukonat (E574) dan telah dinilai sebagai asupan harian oleh Organisasi Kesehatan Dunia. Fermentasi *Aspergillus niger* "generally recognized as safe" (GRAS) oleh Amerika Serikat Food and Drug Administration di bawah Undang-Undang Makanan, Obat, dan Kosmetik federal.

Banyak enzim yang berguna yang dihasilkan dan digunakan pada industri fermentasi. Misalnya, *Aspergillus niger* glukoamilase digunakan dalam produksi sirup jagung fruktosa tinggi, dan pectinases digunakan dalam sari anggur dan klarifikasi. Alpha-galaktosidase, sebuah enzim yang memecah gula kompleks tertentu, adalah sebuah komponen Beano dan produk lain yang menurunkan gas dalam perut. Lain digunakan untuk *Aspergillus niger* dalam industri bioteknologi dalam produksi isotop yang mengandung magnet varian biologi makromolekul untuk analisis NMR.

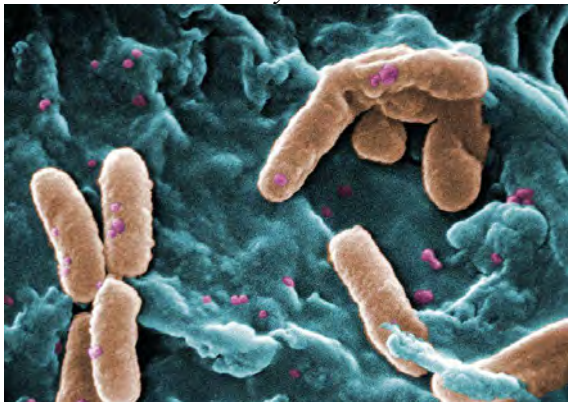
#### ***Zymomonas mobilis***

*Zymomonas mobilis* adalah bakteri yang berbentuk batang, termasuk dalam bakteri garam negatif, tidak membentuk spora, dan merupakan bakteri yang dapat bergerak (*Lee, et al, 1979*).

*Zymomonas mobilis* mempunyai klasifikasi ilmiah sebagai berikut:

Kingdom : Bakteri  
Phylum : Proteobacteria  
Class : Alpha Proteobacteria  
Order : Sphingomonadales  
Family : Sphingomonadaceae  
Genus : *Zymomonas*  
Species : *Zymomonas mobilis*

**Gambar II.10** *Zymomonas mobilis*



Bakteri ini banyak digunakan di perusahaan bioetanol karena menghasilkan kemampuan yang dapat melampaui ragi dalam beberapa aspek. Menurut Gunasekaran, 1999 *Zymomonas mobilis* memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan *Sacharomyces cerevisiae* yaitu:

1. Dapat tumbuh secara anaerob fakultatif dan mempunyai toleransi suhu yang tinggi.
2. Mempunyai kemampuan untuk mencapai konversi yang lebih tinggi.
3. Tahan terhadap kadar etanol yang tinggi dan pH yang rendah.
4. Mampu menghasilkan *yield* etanol 92% dari nilai teoritisnya.

Bakteri ini awalnya terisolasi dari minuman beralkohol seperti tuak Afrika, Meksiko pulque, dan juga sebagai kontaminan dari sari buah apel dan bir di negara Eropa. Suhu optimum proses fermentasi dengan menggunakan *Zymomonas mobilis* adalah pada kisaran pH 4-7. Karakteristik menarik *Zymomonas mobilis* adalah bahwa perusahaan membran plasma mengandung hopanoid, senyawa pentasiklik mirip dengan eukariotik sterol. Hal ini memungkinkan untuk memiliki toleransi yang luar biasa untuk kondisi lingkungan yang mengandung etanol sekitar 14-15% (Gunasekaran, 1986).

### ***Saccharomyces cerevisiae***

*S. cerevisiae* merupakan khamir sejati tergolong eukariot yang secara morfologi hanya membentuk blastospora berbentuk bulat lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang dipengaruhi oleh strainnya. Dapat berkembang biak dengan membelah diri melalui "budding cell". Reproduksi dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan serta jumlah nutrisi yang tersedia bagi pertumbuhan sel. Penampilan makroskopik mempunyai koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak dan

memiliki sel bulat dengan askospora 1-8 buah.

Taksonomi *Saccharomyces* spp. menurut Sanger (2004), sebagai berikut :

Kingdom	: Eukaryota
Phylum	: Fungi
Subphylum	: Ascomycota
Class	: Saccharomycetes
Order	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Saccharomyces</i>
Species	: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>



**Gambar II.11** *Saccharomyces cerevisiae*



Khamir dapat berkembang biak dalam gula sederhana seperti glukosa, maupun gula kompleks disakarida yaitu sukrosa (MARX, 1991). Selain itu untuk menunjang kebutuhan hidup diperlukan oksigen, karbohidrat, dan nitrogen. Pada uji fermentasi gula-gula mempunyai reaksi positif pada gula dekstroza, galaktosa, sukrosa, maltosa, raffinosa, trehalosa. Komposisi kimia *S. cerevisiae* terdiri atas : protein kasar 50-52%, karbohidrat ; 30-37%; lemak 4-5%; dan mineral 7-8%.

## **II.7. Hidrolisis**

Hidrolisis merupakan proses pemecahan suatu senyawa menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air (Othmer, 1967).

Jenis hidrolisis ada lima macam yaitu sebagai berikut:

1. Hidrolisis murni

Pada proses ini hanya melibatkan air saja, proses ini tidak dapat menghidrolisis secara efektif karena reaksi berjalan lambat, hidrolisis murni ini biasanya hanya untuk senyawa yang sangat reaktif dan reaksi dapat dipercepat dengan memakai uap air.

2. Hidrolisis dengan larutan asam

Hidrolisis ini menggunakan larutan asam sebagai katalis, larutan asam yang digunakan dapat encer atau pekat seperti  $H_2SO_4$  atau  $HCl$ .

3. Hidrolisis dengan larutan basa

Hidrolisis ini menggunakan larutan basa encer maupun pekat sebagai katalis, basa yang digunakan pada umumnya adalah NaOH atau KOH, selain berfungsi sebagai katalis, larutan basa pada proses hidrolisis berfungsi untuk mengikat asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke kanan.

4. Alkali fusion

Hidrolisis ini dilakukan tanpa menggunakan air pada suhu tinggi, misalnya dengan menggunakan NaOH padat.

5. Hidrolisis dengan enzim

Hidrolisis ini dilakukan dengan menggunakan enzim sebagai katalis, enzim yang digunakan dihasilkan dari mikroba seperti enzim  $\alpha$ -amylase yang diperoleh dari *Bacillus subtilis* menghidrolisis pati dengan hasil utama maltoheksosa, maltopentosa, dan sedikit glukosa 4-5% (Groggins, 1958).

Hidrolisis asam adalah hidrolisis dengan menggunakan asam yang dapat mengubah polisakarida (pati, selulosa) menjadi gula. Dalam hidrolisis asam biasanya digunakan asam klorida (HCl) atau asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) dengan kadar tertentu. Hidrolisis ini biasanya dilakukan dalam tangki khusus yang terbuat dari baja tahan karat atau tembaga yang dihubungkan dengan pipa saluran pemanas dan pipa saluran udara untuk mengatur tekanan dalam udara (Soebijanto, 1986).

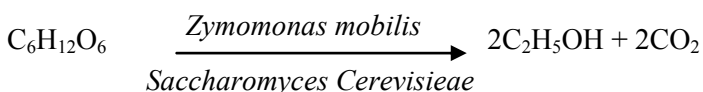
Reaksi hidrolisis secara kimia dapat dilakukan dengan menggunakan asam encer maupun asam pekat. Proses hidrolisis menggunakan asam encer terdiri dari dua tahap. Tahap pertama adalah konversi bahan berselulosa menjadi gula sederhana dan tahap kedua adalah degradasi gula sederhana yang terbentuk

menjadi struktur kimia yang lain. Degradasi gula tersebut tidak hanya menurunkan konversi reaksi, namun juga dapat meracuni mikriorganisme pada saat reaksi fermentasi pada pembentukan etanol.

Selain asam encer, proses hidrolisis selulosa dilakukan pada temperatur yang lebih rendah daripada asam encer. Konsentrasi asam yang digunakan adalah 10-30% (*Zimbardi et al*). Sumber asam yang biasa digunakan adalah asam sulfat. Temperatur reaksi adalah 100°C dan membutuhkan waktu reaksi antara 2-6 jam. Temperatur yang lebih rendah meminimalisasi degradasi gula. Keuntungan dari penggunaan asam pekat ini adalah konversi gula yang dihasilkan tinggi, yaitu bisa mencapai konversi 90% (*Badger,2002*).

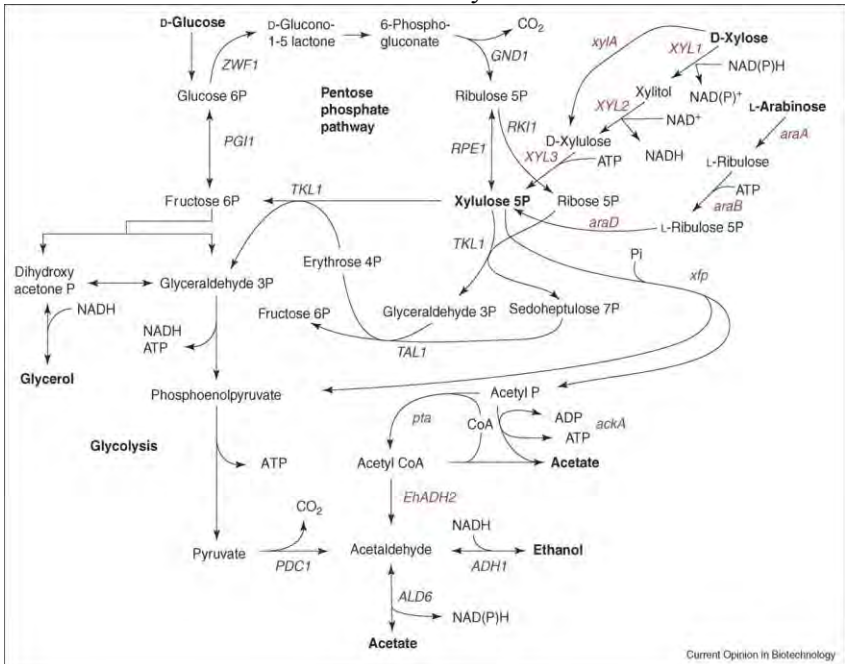
## II.8 Fermentasi

Fermentasi adalah proses produksi energi dalam sel dalam keadaan anaerobik (tanpa oksigen). Secara umum, fermentasi adalah salah satu bentuk respirasi anaerobik, akan tetapi terdapat definisi yang lebih jelas yang mendefinisikan fermentasi sebagai respirasi dalam lingkungan anaerobik dengan tanpa elektron eksternal (*Dirmanto,2006*). Reaksi proses pembentukan etanol dengan fermentasi sebagai berikut:



Pada pembuatan ethanol, bahan-bahan yang mengandung selulosa atau hemiselulosa tersebut dilapisi oleh lapisan lignin sehingga selulosa sulit untuk didegradasi untuk menjadi monomer glukosa. Untuk mengatasi masalah ini, maka perlu dilakukan pretreatment lignin yang terkandung dalam limbah sebelum dilakukan hidrolisa sehingga menghasilkan gula reduksi yang dapat difermentasikan. Dengan demikian selulosa dapat

Skema reaksi produksi etanol ditunjukkan sebagai berikut



jamur. Unsur-unsur yang terkandung dalam media fermentasi ini antara lain :

- Karbon, berfungsi sebagai unsur utama dalam pembentukan sel.
- Nitrogen, berfungsi dalam pembentukan asam amino, DNA, RNA dan ATP.
- Hidrogen, berfungsi dalam pembentukan sel.
- Oksigen, berfungsi dalam pembentukan sel.
- Fosfor, berfungsi sebagai kofaktor enzim dan pembentukan asam nukleat.
- Sulfur, berfungsi sebagai kofaktor enzim.
- Kalium, berfungsi sebagai kofaktor enzim.
- Magnesium, berfungsi untuk menjaga kestabilan ribosom, membran sel dan asam nukleat; sebagai kofaktor enzim, sebagai komponen dari klorofil.
- Kalsium, berfungsi sebagai kofaktor enzim.

## II.10 Penelitian Terdahulu

1. Tan, H.T., Lee, K.T., and Mohamed, A.R. 2011. Pretreatment lignoselulosa dari daun kelapa sawit dilakukan dengan larutan ionic liquid BMIMCl ( 1-Butyl-3-methylimidazoliun Chloride). Variabel yang digunakan dalam percobaan ini adalah *temperature*, *retention time*, dan *solid loading*. Hasil yang diperoleh adalah terjadi kenaikan jumlah glukosa recovery dengan kenaikan temperature, sedangkan pada waktu 60 menit dengan kenaikan temperature mengakibatkan penurunan glukosa recovery. Untuk solid loading dan temperature diperoleh hasil bahwa % glucose recovery tertinggi terjadi pada temperature 100 °C dan solid loading 10%. Kondisi optimal dari percobaanya adalah temperature 80 °C, 15 menit retention time, dan 10 % solid loading.
2. Trihartini, L. E. dan Pratiwi, W. H. 2011. Melakukan percobaan hidrolisa jerami padi secara enzimatik dan

- pretreatment basa untuk produksi hydrogen. Variabel yang digunakan pada waktu pretreatment adalah konsentrasi NaOH 1%, 2%, dan 4% wt/ vol, waktu pretreatment 8 dan 16 jam, serta suhu operasi 60 °C dan 80 °C, hasil yang optimal pretreatment diperoleh pada suhu 80 °C, konsentrasi NaOH 4%.
3. Yuwono, T dan Rolanda, E. 2012. Melakukan penelitian mengenai pembuatan gas hidrogen dari bagase tebu, serta pengaruh konsentrasi NaOH pada pretreatment bagase tebu. Hasil yang diperoleh 0,11 gram gula reduksi/ gram bagase tebu untuk NaOH 4% wt/v, 0,035 gram gula reduksi/ gram bagase tebu untuk NaOH 8% wt/v, 0,023 gram gula reduksi/ gram bagase tebu untuk NaOH 12 %wt/v. sedangkan untuk fermentasi diperoleh 0.969 mmol gas hydrogen/ mmol gula reduksi, kondisi pretreatment adalah waktu pretreatment 16 jam pada suhu 80 °C. Sedangkan kondisi fermentasi dengan waktu 48 jam suhu 30 °C, tekanan 1 atm dan pH 7. Kesimpulan yang diperoleh adalah konsentrasi NaOH terbaik dari 3 variabel yang digunakan adalah 4 % wt/ vol.
  4. Muhammad Asgher (2012), *pretreatment* ampas tebu dengan basa (NaOH 4%) dan ekstrak enzim *ligninolytic* (25 ml) yang dihasilkan dari *Pleurotus ostreatus* IBL-02 untuk depolimerisasi lignin dan mengekspos polimer selulosa, dilanjutkan dengan sakarifikasi dan fermentasi oleh *strain* murni *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol.
  5. Koullas D. P., dkk (1992) melakukan penelitian tentang efek dari delignifikasi basa pada sakarifikasi jerami gandum dengan enzim selulase dari strain *Fusarium Oxysporum*. Proses dilakukan dalam dua kondisi yaitu suhu panas (120°C). Pada kondisi panas NaOH yang ditambahkan masing-masing 0%, 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% dengan waktu 30 menit. Pada konsentrasi NaOH

10% didapat kadar lignin terendah yaitu 4,3% sedangkan kadar selulosa dan hemiselulosa masing-masing 37,5% dan 15%. Kadar selulosa tertinggi didapat pada konsentrasi NaOH 4% dengan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin masing-masing sebesar 44,6%; 15,4% dan 14,5%.

6. K. srilekha Yadav, (2011) memproduksi etanol dari jerami padi dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*. 1000 gram jerami padi ditambahkan dengan 0,2 M KOH dengan ratio 1:10 w/v selama 4 jam pada temperature 30 C untuk degradasi lignin. 50 gram jerami padi hasil dari proses delignifikasi ditambahkan dengan 1 L asam sulfat dengan perbandingan 1 : 10. Gula dengan kadar 30 g/L difermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae* selama 36 jam dengan yield 0,3 gram etanol/gram glukosa. Gula juga difermentasikan menggunakan campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis* selam 36 jam dengan yield 0,4 gram etanol/gram glukosa.
7. Anita Singh (2012), ampas tebu yang telah di-pretreatment dengan basa digunakan sebagai substrat untuk produksi enzim selulolitik, yang diperlukan untuk hidrolisis biomassa. Ampas tebu yang telah di-pretreatment, dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim selulase yang belum diolah (Filter paper activity 9.4 FPU/g), endoglucanase (carbox-ymethylcellulase, 148 IU/g), b-glucosidase (116 IU/g) dan xylanase (201 IU/g), yang diproduksi oleh *Aspergillus flavus*. Hidrolisat enzimatik pekat digunakan untuk produksi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* pada berbagai matriks. Etanol yang dihasilkan yaitu 0.44 gp/gs menggunakan ampas tebu, 0.38 gp/gs menggunakan kalsium alginate, dan 0.33 gp/gs menggunakan agar-agar sebagai matriks imobilisasi. Dalam prosesnya dilakukan sampai 10 siklus untuk ampas

- tebu, dan sampai 4 siklus untuk kalsium alginate maupun agar-agar dengan fermentasi secara batch.
8. Nana Dyah S, Luluk Edahwati, (2011), “Bioethanol dari Limbah Kulit Kopi dengan Proses Fermentasi”. Penelitian ini mengkaji tentang produk ethanol dengan proses fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* menggunakan HCl 20%v dihasilkan kadar glukosa 10,04%, glukosa ini mendapat perlakuan fermentasi yang optimum selama 7 hari dihasilkan kadar ethanol 9-12%.



## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan bioethanol dari kulit kopi dengan memanfaatkan komponen selulosa maupun hemiselulosanya menggunakan variasi perlakuan *pretreatment* dan variasi mikroorganisme pada proses fermentasi.

#### **III.1 Variabel Eksperimen**

Pada eksperimen ini direncanakan menggunakan tiga jenis variabel yaitu sebagai berikut :

- a. Variasi pelarut *pre-treatment* penghilangan lignin :
  - Larutan etanol dengan kadar 10%; 20%; 30%; 40%; 50%
  - Larutan NaOH dengan konsentrasi 1%
- b. Variasi mikroorganisme pada proses fermentasi :
  - *Saccharomyces cerevisiae*
  - *Zymomonas mobilis*

#### **III.2 Kondisi Operasi Penelitian :**

- Pretreatment kulit kopi:
  - Tekanan : 1 atm
  - Ukuran partikel substrat : 100-120 mesh
- Produksi enzim selulase:
  - pH : 3
  - Temperatur operasi : 32°C
  - Kecepatan inkubator shaker : 175 rpm
  - Jenis strain : *Trichoderma reesei*  
dan *Aspergillus niger*
  - Substrat : Jerami padi dan dedak gandum
- Produksi enzim xilanase:
  - pH : 3
  - Temperatur operasi : 32°C
  - Kecepatan inkubator shaker : 175 rpm

Jenis strain	: <i>Trichoderma reesei</i> dan <i>Aspergillus niger</i>
Substrat	: Jerami padi dan dedak gandum
➤ Hidrolisis kulit kopi:	
Jenis enzim	: enzim selulase dan enzim xilanase
Temperatur operasi	: 60°C
Kecepatan inkubator shaker	: 125 rpm
Waktu operasi	: 28 jam
Substrat	: kulit kopi
Ukuran partikel substrat	: 100-120 mesh
Volume cairan	: 150 ml
➤ Fermentasi	
Jenis mikroorganisme	: <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> dan <i>Zymomonas mobilis</i>
Temperatur operasi	: 30°C
Kecepatan inkubator shaker	: 125 rpm
Waktu operasi	: 48 jam

### III.3 Dimensi Alat

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini :

- |                        |                 |
|------------------------|-----------------|
| 1. Tabung reaksi.      | 9. Gelas ukur   |
| 2. Spektrofotometer    | 10. Cawan       |
| 3. Inkubator shaker    | 11. Kaca arloji |
| 4. Autoclave           | 12. Spatula     |
| 5. Centrifuge          | 13. Kawat ose   |
| 6. Hot plate & stirrer | 14. Pipet ukur  |
| 7. Erlenmeyer          | 15. Vortex      |
| 8. Beaker glass        | 16. Oilbath     |

### III.4 Bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah:

- |                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| 1. Kulit buah kopi           | 3. <i>Aspergillus niger</i> |
| 2. <i>Trichoderma reesei</i> |                             |

- |   |   |
|---|---|
| 4. <i>Saccharomyces</i>                       | 16. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  |
| <i>sereviceae</i>                             | 17. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ |
| 5. <i>Zymomonas mobilis</i>                   | 18. Dinitrosalicylic acid                     |
| 6. NaOH                                       | (DNS)   |
| 7. Asam sitrat                                | 19. Sodium potassium                          |
| 8. Ethanol                                    | tartrate                                      |
| 9. $\text{H}_2\text{SO}_4$                    | 20. Sodium metabisulfit                       |
| 10. YeastEkstrak                              |   |
| 11. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$              | 21. Potato dextrose agar                      |
| 12. $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | (PDA)   |
| 13. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 22. CMC ( <i>carboxymetil</i>                 |
| 14. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | <i>cellulose</i> )                            |
| 15. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 23. Aquadest                                  |

### III.5 Metode Eksperimen

Penelitian ini di bagi dalam 5 tahap :

1. Tahap *pre-treatment* kulit buah kopi
2. Tahap produksi crude enzim selulase dan crude enzim xilanase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma ressei*.
3. Tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit kopi menjadi glukosa dan xylosa oleh campuran enzim murni selulase dengan enzim murni xylanase dan campuran crude enzim selulase dan crude enzim xilanase.
4. Tahap fermentasi hidrolisat kulit kopi menjadi etanol oleh variasi mikroorganisme *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces sereviceae*.

#### Tahap 1: *Pre-treatment* kulit buah kopi :

##### A. Tahap *pre-treatment* kulit kopi secara mekanik

- Mengeringkan kulit kopi dengan bantuan sinar matahari
- Memotong kulit kopi dengan ukuran 1 cm.
- Menggiling kulit kopi dengan mesin penggiling.
- Mengoven kulit kopi pada suhu  $105^\circ \text{C}$  selama 4 jam.

- Mengayak dengan menggunakan screener dan mengambil kulit kopi yang berukuran 100-120 mesh.

**B. Tahap pre-treatment kulit kopi secara kimiawi**

**1. Dengan menggunakan Larutan etanol dengan kadar 10%; 20%; 30%; 40%; 50%**

- Memasukkan kulit kopi dan asam sitrat kedalam labu leher dua yang berisi stirer dengan perbandingan 1:16 (w/w).
- Menambahkan NaOH 4N sampai pH nya menjadi 3. ( $\pm$  penambahan NaOH 4N sebanyak 280 ml).
- Mengaduk larutan dengan kecepatan 600 rpm, suhu 80°C, dan lama pengadukan 75 menit.
- Memisahkan padatan yang terbentuk dari larutan yang selanjutnya dilakukan proses delignifikasi.
- Menambahkan padatan dengan ethanol konsentrasi 10%; 20%; 30%; 40%; 50% dan diaduk dengan kecepatan 500 rpm selama 2 jam.
- Memisahkan padatan dari cairan dan kemudian padatan dicuci dengan aquades.
- Mengoven padatan kulit kopi pada suhu 60° C hingga beratnya konstan.
- Menghaluskan padatan kulit kopi hasil oven dengan blender kemudian dikemas.

**2. Dengan menggunakan larutan NaOH dengan konsentrasi 1% (Widjaja dkk, 2009)**

- Menimbang kulit kopi 25 gram dan menambahkan 1000 ml larutan NaOH dengan konsentrasi 1% (w/v) ke dalam labu leher dua.
- Memanaskan dan mengaduk dengan stirrer selama 16 jam pada suhu 80° C.
- Larutan didinginkan kemudian disaring dengan pompa vakum.
- Padatan yang telah terpisah dicuci dengan aquades sampai pH filtrate menjadi 7.

- Mengoven padatan pada suhu 60°C sampai beratnya konstan.
- Mendinginkan padatan dan menghaluskan kemudian dikemas.
- Padatan kulit kopi yang sudah halus dioven kembali sebelum dihidrolisa.

**C. Prosedur analisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode chesson (Datta dkk, 1981)**

**1. Prosedur pembuatan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N**

- Mengambil sedikit aquadest di dalam labu ukur 1000 ml.
- Menambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% sebanyak 27 ml ke dalam labu ukur 1000 ml dengan hati-hati.
- Menambahkan aquadest hingga batas.

**2. Prosedur pembuatan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72%**

- Mengambil sedikit aquadest di dalam labu ukur 10 ml.
- Menambahkan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% sebanyak 3,7 ml ke dalam beaker glass dengan hati-hati.
- Menambahkan aquadest hingga batas.

**3. Prosedur analisa kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin dengan metode chesson**

- Menimbang 1 gr sampel kering (berat a) ditambahkan 150 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dan direflux pada suhu 100°C dengan *oilbath* selama 1 jam.
- Hasilnya disaring, residu dicuci dengan air panas hingga filtratnya jernih ( $\pm$  300 ml air panas yang ditambahkan).
- Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 60 °C sampai beratnya konstan dan kemudian ditimbang (berat b).
- Residu ditambahkan 150 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N, kemudian direflux dengan *oilbath* selama 1 jam pada suhu 100°C.

- Hasilnya disaring dan dicuci air panas sampai pH nya netral ( $\pm 300$  ml) dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan. Berat ditimbang (berat c).
- Residu kering ditambahkan 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam.
- Ditambahkan 150 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N dan direflux pada suhu  $100^\circ\text{C}$  dengan *oilbath* selama 1 jam.
- Residu disaring dan dicuci dengan  $\text{H}_2\text{O}$  sampai netral ( $\pm 400$  ml).
- Residu kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu  $60^\circ\text{C}$  sampai beratnya konstan dan ditimbang (berat d).
- Selanjutnya residu diabukan dengan furnace pada suhu  $600^\circ\text{C}$  selama 4 jam dan ditimbang (berat e).

**Perhitungan kadar Selulosa dan kadar Lignin menggunakan rumus berikut ini:**

Kadar Hemiselulose =  $(b - c) / a \times 100\%$

Kadar Selulosa =  $(c - d) / a \times 100\%$

Kadar Lignin =  $(d - e) / a \times 100\%$

## **Tahap 2: Produksi enzim selulase dan xilanase dari strain jamur *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*:**

### **A. Pemiakan Jamur (*T. reesei* dan *A. niger*)**

- Melarutkan 3,9 gram PDA dalam 100 ml *aquadest* dengan cara diaduk sambil dipanaskan di atas *hotplate* pada suhu  $80^\circ\text{C}$ .
- Menuangkan larutan campuran ke tiap tabung reaksi sebanyak 5 ml.
- Menutup tabung reaksi menggunakan kapas yang telah dibungkus kasa dan melapisi dengan aluminium foil.
- Mensterilisasi media beserta tabung reaksi di *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 1,5 psia selama 15 menit.
- Mendinginkan larutan pada suhu kamar dengan posisi tabung reaksi miring.

- Menggoreskan biakan jamur (*T.reesei* dan *A. niger*) kedalam masing-masing tabung reaksi dan menginkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

**B. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 5,5**

- Menimbang 5,7024 gram asam sitrat dimasukkan ke erlemeyer.
- Menambahkan 20,6682 gram sodium sitrat.
- Melarutkan asam sitrat dan sodium sitrat dengan aquades hingga 1000 ml.
- Mengatur pH larutan buffer dengan ditambah NaOH 0,1 M atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 5,5.

**C. Pembuatan Larutan Buffer Sitrat pH 3**

- Menimbang 17,87 gram asam sitrat dimasukkan ke erlemeyer.
- Menambahkan 2,06 gram sodium sitrat.
- Melarutkan asam sitrat dan sodium sitrat dengan aquades hingga 1000 ml.
- Mengatur pH larutan buffer dengan ditambah NaOH 0,1 M atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M hingga pH larutan buffer menjadi 3.

**D. Pembuatan Media Fermentasi untuk Produksi Enzim Selulase dan Enzim Xilanase**

- Menggiling jerami padi dan dedak gandum hingga berukuran 100-120 mesh sebagai substrat untuk pertumbuhan.
- Menimbang masing-masing jerami padi dan dedak gandum 5 gram.
- Melarutkan substrat kedalam media fermentasi sebanyak 25 ml.

- Komposisi media fermentasi terdiri dari :

Komponen	Komposisi(gr/L)
YeastEkstrak	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,8
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7

- Mengatur pH media fermentasi menggunakan buffer sitrat pH 5,5 hingga pH media fermentasi mencapai 5,5.
- Mensterilkan media fermentasi dan substrat ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya didinginkan pada suhu ruangan.

#### ***E. Pembuatan Crude Enzim***

- Menginokulasi jamur (*T.reesei* dan *A. niger*) sebanyak 2 cm<sup>2</sup> ke dalam media fermentasi yang telah dibuat ditahap sebelumnya.
- Menginkubasi media fermentasi yang berisi suspensi jamur kedalam inkubator pada suhu 32°C selama 8 hari.
- Media fermentasi yang telah ditumbuhi jamur ditambahkan dengan 100 ml larutan buffer sitrat pH 3 yang mengandung 0,1 % Tween-80.
- Menghomogenkan larutan dengan orbital shaker pada 175 rpm selama 135 menit.



- Larutan campuran disentrifugasi pada suhu 4°C dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit.
- Memisahkan filtrat dengan mycelia beserta endapan media di dalamnya dimana supernatan mengandung enzim menggunakan kertas saring halus.

***F. Pembuatan Enzim Selulase Murni dari *Aspergillus niger* dan Enzim Xilanase Murni dari *Trichoderma reesei****

- Menimbang masing-masing 1 gram dari enzim selulase dan enzim xilanase murni dimasukkan dalam masing-masing labu ukur 1000 ml
- Menambahkan buffer sitrat pH 3 ke dalam labu ukur tersebut sampai volume tepat 100 ml. padatan enzim dipastikan larut sempurna.

***G. Tahap pengujian***

**1. Pembuatan larutan DNS (Asam Dinitrosalisilat) (Widjaja dkk, 2009)**

- Menimbang 16 gram NaOH dilarutkan menggunakan aquades sampai volume 200 ml aquades.
- Menimbang 30 gram sodium potassium tartrate dan 8 gram sodium metabisulfit dilarutkan dengan aquades sampai volume 500 ml.
- Melarutkan 10 gram DNS menggunakan larutan NaOH sebanyak 200 ml.
- Menambahkan larutan DNS kedalam larutan sodium potassium tartrate dan sodium metabisulfit
- Menambahkan aquades sampai volumenya tepat 1000 ml. Larutan diaduk sampai benar-benar terlarut sempurna

**2. Pembuatan Larutan CMC (*Carboxymetil Cellulose*) (Widjaja, 2009)**

- Menimbang 2 gram CMC.
- Menambahkan 200 ml buffer sitrat pH 5,5.
- Mengaduk dengan stirrer selama 16 jam.

**3. Pembuatan kurva standard glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulase dan enzim xilanase (Widjaja dkk, 2009) :**

- Menimbang sebanyak 0,367 gram glukosa dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml.
- Menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 sampai volume tepat 100 ml.
- Mengisi masing-masing 6 tabung reaksi dengan larutan induk glukosa berturut-turut sebanyak 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml dan 5 ml.
- Menambahkan masing-masing buffer sitrat 0,1 M pH 5,5 berturut-turut sebanyak 5 ml, 4 ml, 3 ml, 2 ml, 1 ml dan 0 ml, sehingga diperoleh 6 macam konsentrasi larutan standar glukosa.
- Mengambil 0,2 ml dari tiap konsentrasi larutan standar glukosa dan ditambahkan 1,8 ml CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi.
- Menambahkan masing-masing larutan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) dan divortex hingga homogen.
- Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan pada air es selama 15 menit.
- Mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat dengan cara mengeplot konsentrasi glukosa terhadap absorbansi.

**4. Pembuatan Larutan Xilan**

- Menimbang 2 gram xilan.
- Menambahkan 200 ml buffer sitrat pH 5,5.
- Mengaduk dengan stirrer selama 16 jam.

**5. Uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase :**

**5.1 Prosedur pembuatan untuk larutan blanko :**

- Memasukkan larutan buffer sitrat pH 5,5 sebanyak 2ml kedalam tabung reaksi.

- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) kedalam tabung reaksi.
- Memanaskan campuran dalam air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 15 menit.

## **5.2 Prosedur uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase sebelum di koreksi (Widjaja, 2009):**

- Memasukkan 0,2 ml enzim selulase dan enzim xilanase kemudian di masukkan kedalam masing-masing tabung reaksi.
- Menambahkan 1,8 ml larutan CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi berisi enzim selulase dan 1,8 ml larutan xilan ke dalam tabung reaksi berisi enzim xilanase.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.
- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih 100°C selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 15 menit.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.

## **5.3 Prosedur uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase untuk larutan koreksi :**

- Memasukkan 0,2 ml larutan enzim selulase dan larutan enzim xilanase dan dimasukkan kedalam masing-masing tabung reaksi.
- Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 35°C.
- Menambahkan 3 ml DNS (*dinitrosalicylic acid*) ke dalam masing-masing tabung reaksi.

- Menghomogenkan campuran tersebut dengan menggunakan *vortex*.
- Memanaskan masing-masing tabung reaksi yang berisi larutan pada air mendidih 100°C selama 2 menit.
- Menambahkan 1,8 ml larutan CMC (*carboxymetil cellulose*) ke dalam tabung reaksi berisi enzim selulase dan 1,8 ml larutan xilan ke dalam tabung reaksi berisi enzim xilanase.
- Memanaskan campuran tersebut pada air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan campuran tersebut pada air es selama 15 menit.
- Mengukur absorbansi pada panjang gelombang 540 nm.
- Perhitungan absorbansi (A) = Absorbansi (sebelum) – Absorbansi (sesudah)

### **Tahap 3: Hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit kopi menjadi glukosa oleh enzim selulase dan enzim xilanase.**

#### **A. Prosedur hidrolisis kulit kopi menggunakan enzim murni (Anwar, 2008) :**

- Menimbang 1 gram kulit kopi (100-120 mesh) yang sudah di *pre-treatment* secara kimiawi (*didelignifikasi*) dan memasukkan ke Erlenmeyer.
- Mencampurkan 12,19 ml enzim selulase dari *T.resei*, 7,98 ml enzim selulase dari *Aspergillus niger* dan 20,13 ml enzim xilanase dari *Trichoderma reesei* yang sudah diketahui aktifitasnya dan masing-masing dipanaskan perlahan-lahan sampai 40 °C.
- Menambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 3 ke dalam larutan enzim dan kulit kopi sampai 30 ml.
- Menginkubasi sampel kedalam incubator *shaker* dengan 125 rpm selama 28 jam.

- Menganalisa konsentrasi glukosa dalam hidrolisat dengan metode DNS tiap 2 jam.

**B. Prosedur hidrolisis kulit kopi menggunakan crude enzim (Anwar, 2008) :**

- Menimbang 1 gram kulit kopi (100-120 mesh) yang sudah di *pre-treatment* secara kimiawi (*didelignifikasi*) dan memasukkan ke Erlenmeyer.
- Menambahkan enzim selulase dari *Trichoderma reesei* sebanyak 16,221 ml dan enzim selulase dari *Aspergillus niger* sebanyak 3,54 ml serta enzim xilanase dari *Trichoderma reesei* sebanyak 13,189 ml yang sudah diketahui aktifitasnya dan masing-masing dipanaskan perlahan-lahan sampai 40 °C.
- Menginkubasi sampel kedalam incubator *shaker* dengan 125 rpm selama 28 jam.
- Menganalisa konsentrasi glukosa dalam hidrolisat dengan metode DNS tiap 2 jam.

**C. Prosedur analisa konsentrasi glukosa dan xilosa (Miller, 1959):**

- Mengambil 2 ml sampel yang sedang dihidrolisis setiap selang waktu 2 jam dan dimasukkan di microtube
- Mensentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm untuk memisahkan endapan.
- Mengambil 0,2 ml larutan dan Menambahkan 1,8 ml aquades ke dalam tabung reaksi.
- Menambahkan 3 ml larutan DNS dan dihomogenkan dengan *vortex* biar tercampur merata.
- Memanaskan dengan air mendidih selama 10 menit.
- Mendinginkan dengan air es selama 15 menit.
- Mengukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm.

**Tahap 4 : fermentasi hidrolisat kulit kopi (glukosa dan xylosa) menjadi etanol oleh *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cereviceae* :**

**A. Pengembangan Mikroorganisme :**

*Zymomonas mobilis*

- Melarutkan 4 gram PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan aquadest hingga volumenya 100 ml.
- Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua agar melarut.
- Menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sampai pH 4-5.
- Memasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 6 ml dan menutup mulut tabung dengan kapas.
- Mensterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu mendinginkannya dengan posisi miring.
- Setelah agar mengeras, mengambil biakan murni dengan kawat ose steril dalam incase.
- Menggoreskan kawat ose pada permukaan media agar yang baru dan menutup kembali dengan kapas.
- Menginkubasi selama 7 hari dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam.

*Saccharomyces cerevisiae*

- Melarutkan 4 gram PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan aquadest hingga volumenya 100 ml.
- Mendidihkan sampai suhu 70°C hingga semua agar melarut.
- Menambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sampai pH 4-5.
- Memasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 6 ml dan menutup mulut tabung dengan kapas.
- Mensterilkan dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu mendinginkannya dengan posisi miring.
- Setelah agar mengeras, mengambil biakan murni dengan kawat ose steril dalam incase.
- Menggoreskan kawat ose pada permukaan media agar yang baru dan menutup kembali dengan kapas.

- Menginkubasi selama 7 hari dalam inkubator pada suhu 30°C selama 24 jam.

## B. Analisa Jumlah Sel

Menurut Caprette (2007) metode menghitung jumlah sel menggunakan suatu alat yang disebut dengan *counting chamber* (ruang hitung). Alat ini dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel per unit volume. Tipe *counting chamber* yang paling banyak digunakan adalah *haemocytometer*.

**Gambar III.1** *Haemacytometer* Neubauer



Berikut ini langkah-langkah yang dilakukan untuk analisa jumlah sel bakteri :

1. Mengencerkan 10 ml sampel sebesar 5 – 10 kali atau lebih dengan menggunakan aquades.
2. Meneteskan ke permukaan *counting chamber* hingga dapat menutupi seluruh permukaannya.
3. Kemudian *haemacytometer* diletakkan di bawah lensa mikroskop untuk dihitung jumlah selnya.
4. Melakukan pengamatan di mikroskop dengan perbesaran 400 X.

## C. Pembuatan Starter :

- Menimbang terlebih dahulu nutrisi-nutrisi yang diperlukan
  - Yeast Ekstrak = 0,3315 gram.
  - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0,0663 gram.
  - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  = 0,3315 gram
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 0,828 gram

- Mencampurkan keempat nutrisi tersebut ke 78 ml larutan yang akan difermentasikan, mengambil sebanyak 39 ml untuk dua variable mikroorganisme dari larutan yang akan difermentasikan.
- Mensterilkan ke dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Mendinginkan sampai suhu kamar.
- Mengambil masing-masing biakan *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 386666667 sel/mL dan *Zymomonas mobilis* sebanyak 426666667 sel/mL pada biakan agar miring yang telah diinokulasikan.
- Menanamkan biakan tersebut ke dalam larutan yang dipakai starter.
- Membiakkan dalam inkubator *shaker* pada suhu 30°C selama waktu sesuai dengan masa logaritmik pada kurva pertumbuhan bakteri.

#### **D. Fermentasi Etanol :**

- Memisahkan padatan yang ada dalam hidrolisat dengan centrifuge.
- Menambahkan 39 ml larutan starter ke dalam 99 ml larutan yang akan difermentasikan.
- Menutup Erlenmeyer dengan balon untuk mengindikasikan adanya gas CO<sub>2</sub>.
- Fermentasi dilakukan pada incubator shaker dengan kecepatan 125 rpm dengan suhu 32°C selama 48 jam.
- Mengambil sampel untuk dianalisis.
- Menyimpan sampel tersebut di dalam lemari es.
- Menganalisa kadar etanol menggunakan Gas Kromatografi.



### III.6 Set Up Peralatan Penelitian

#### A. Pretreatment

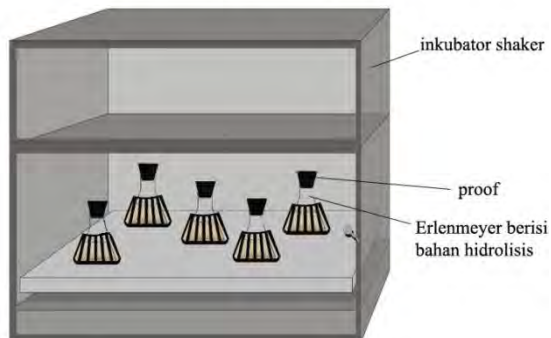
**Gambar III.2** Set-up Peralatan *Pretreatment*

Rangkaian Alat *Pre-treatment*



#### B. Hidrolisa

**Gambar III.3** Set-up Peralatan Hidrolisis  
Rangkaian Alat Hidrolisis



### C. Fermentasi

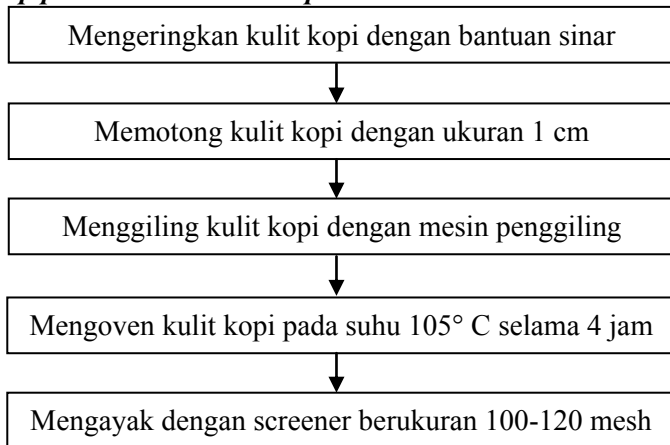
**Gambar III.4** Set-up Peralatan Fermentasi *Batch*



### III.7 Diagram Alir

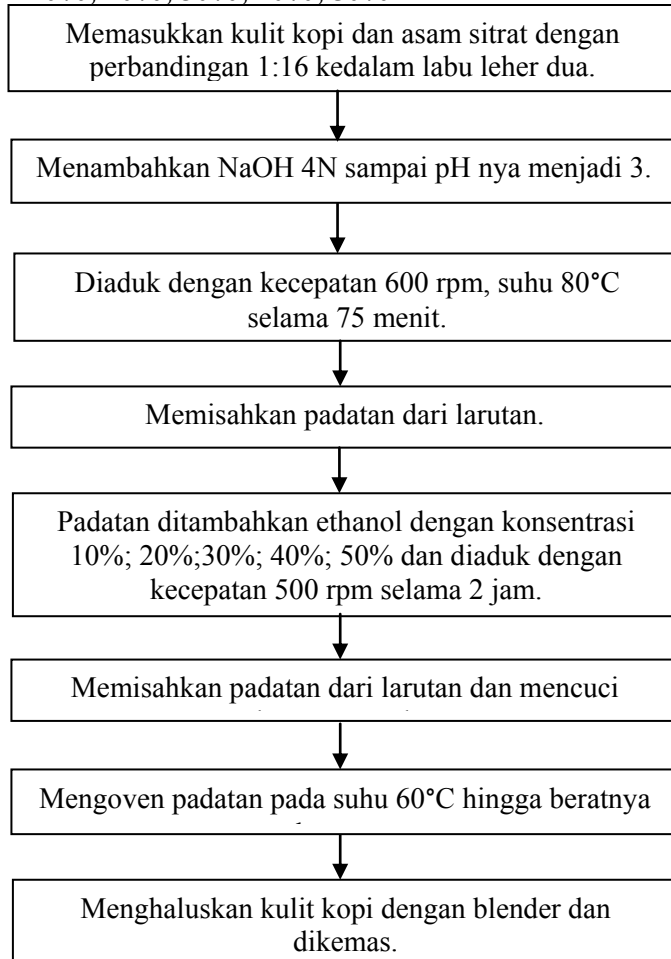
#### III.7.1 Tahap Persiapan

##### A. *Tahap pre-treatment kulit kopi secara mekanik*

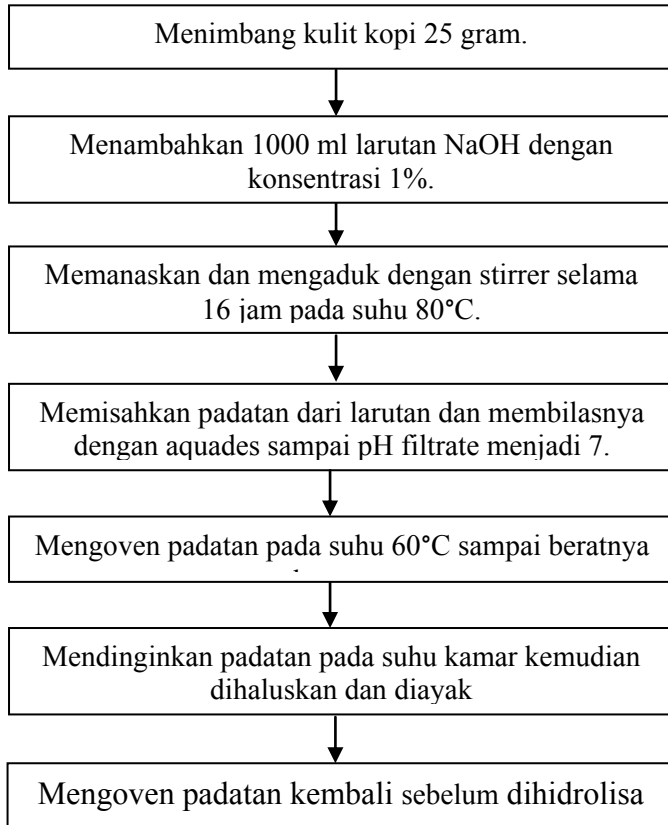


**B. Tahap pre-treatment kulit kopi secara kimiawi**

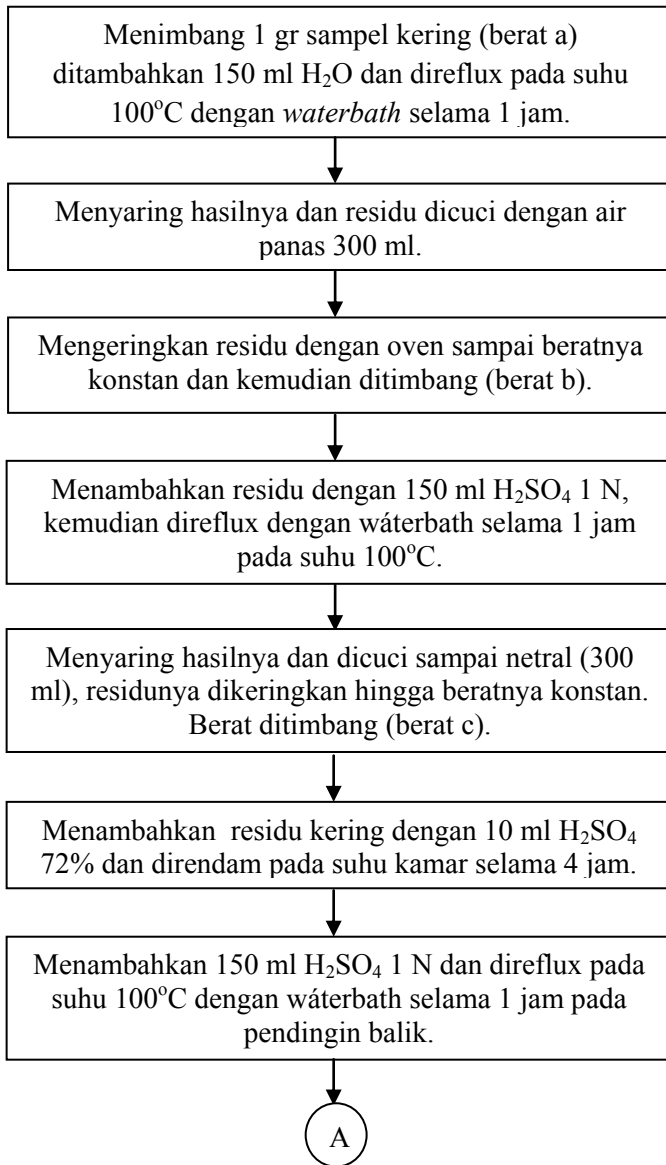
**1. Dengan menggunakan Larutan etanol dengan kadar 10%; 20%; 30%; 40%; 50%**

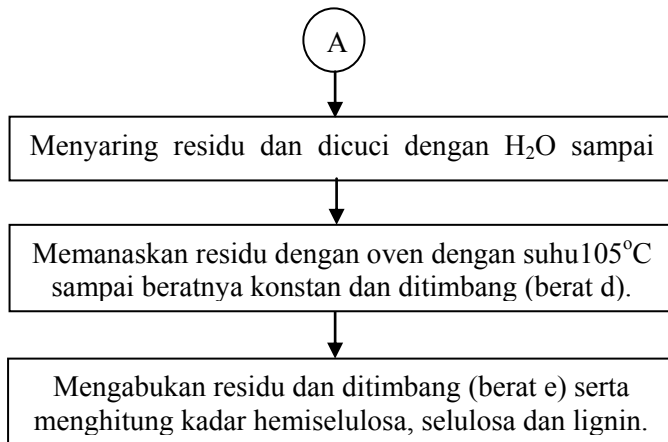


**2. Dengan menggunakan Larutan NaOH dengan konsentrasi 1%**



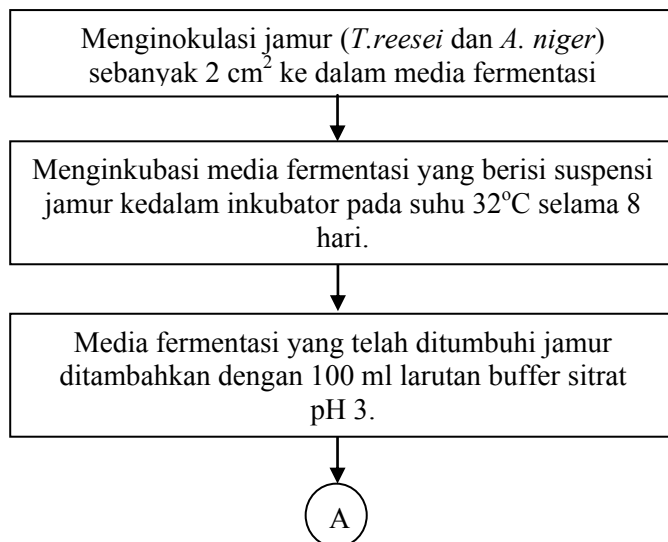
**C. Prosedur analisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin dengan metode chesson (Datta dkk, 1981)**

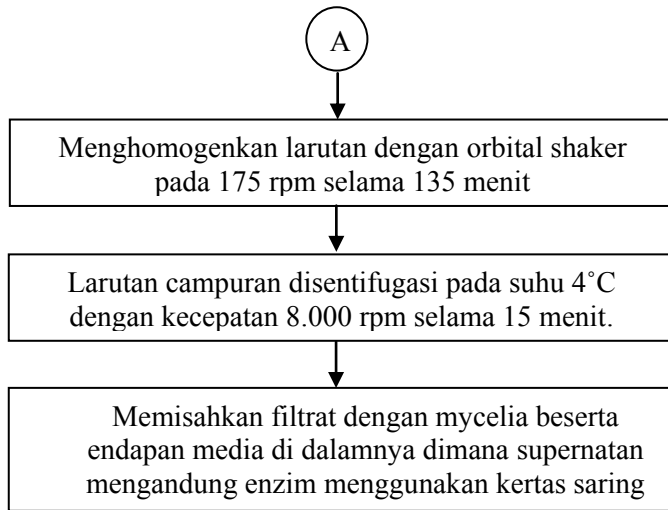




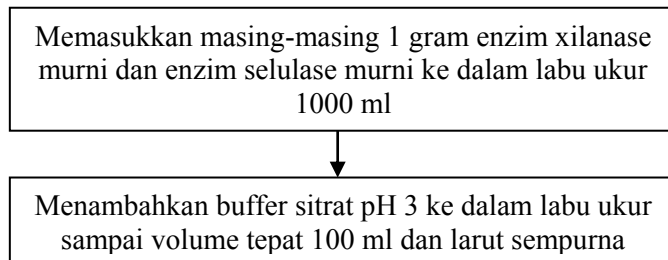
### III.7.2 Tahap produksi enzim selulase dan xilanase dari *Aspergillus niger* Dan *Trichoderma reesei*.

#### A. Pembuatan Crude Enzim Selulase dan Crude Enzim Xilanase



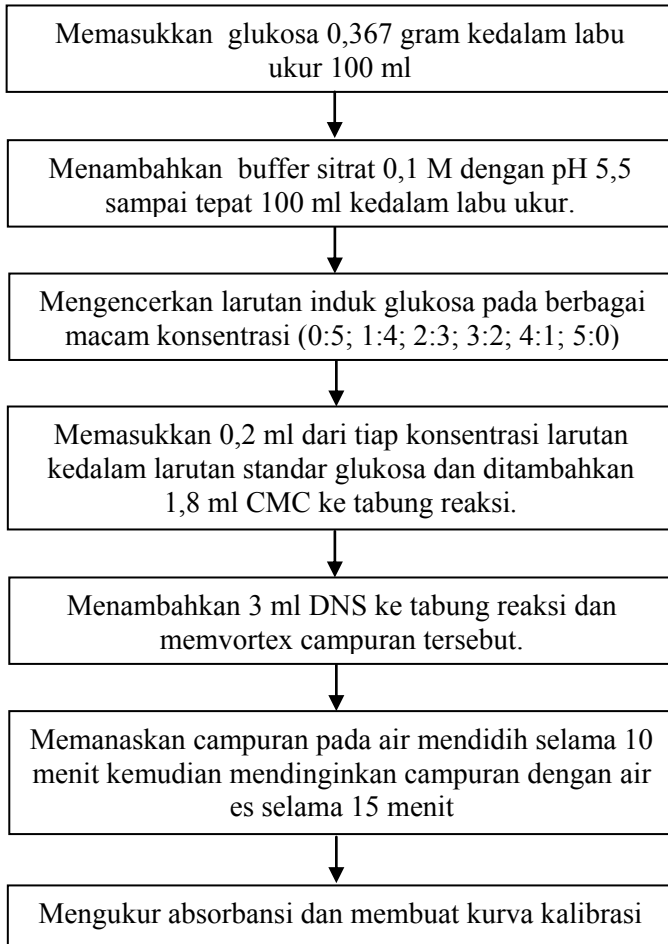


**B. *Pembuatan Larutan Enzim Selulase murni dan Enzim Xilanase murni***



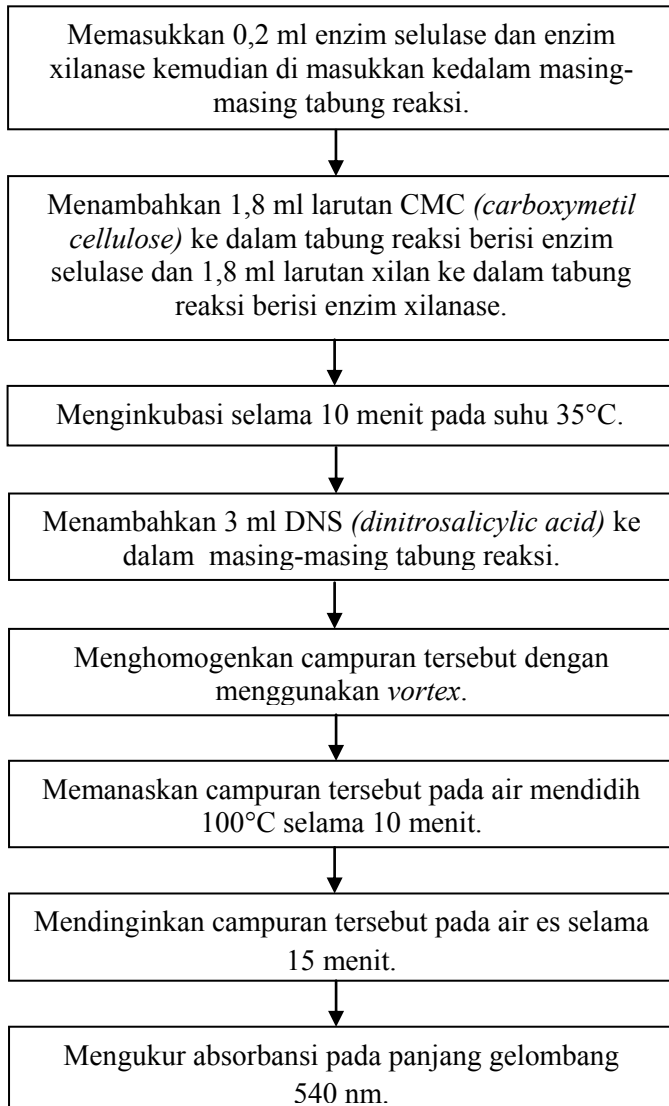
### **C. Tahap pengujian**

#### **1. Prosedur pembuatan kurva standard glukosa untuk mengukur keaktifan enzim selulase (Widjaja, 2009)**

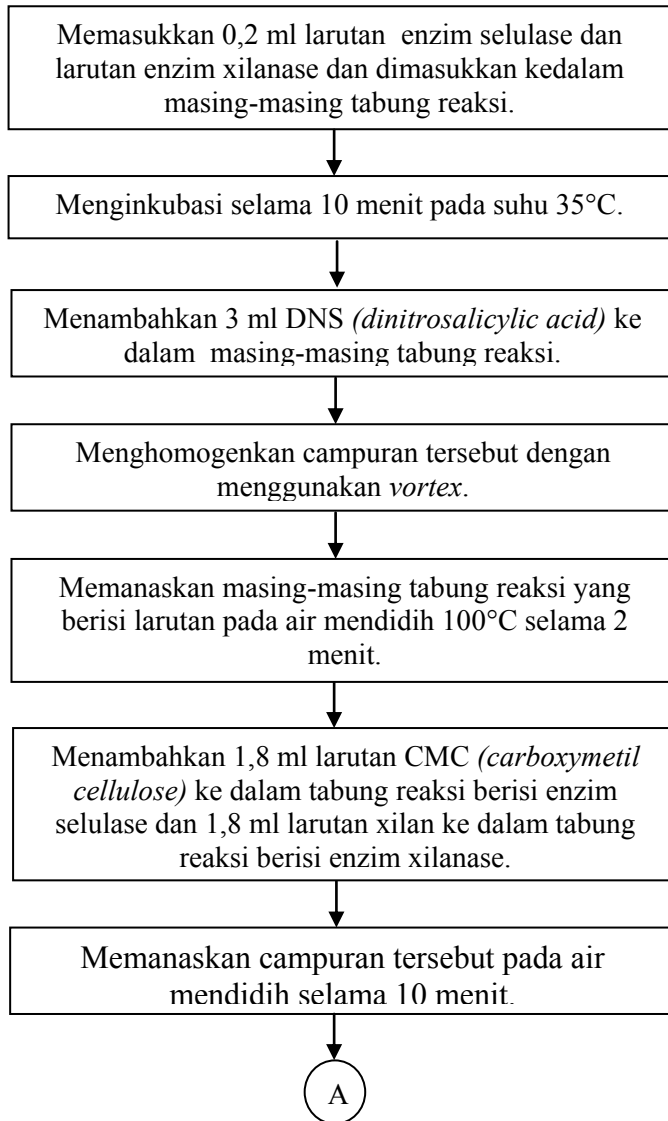


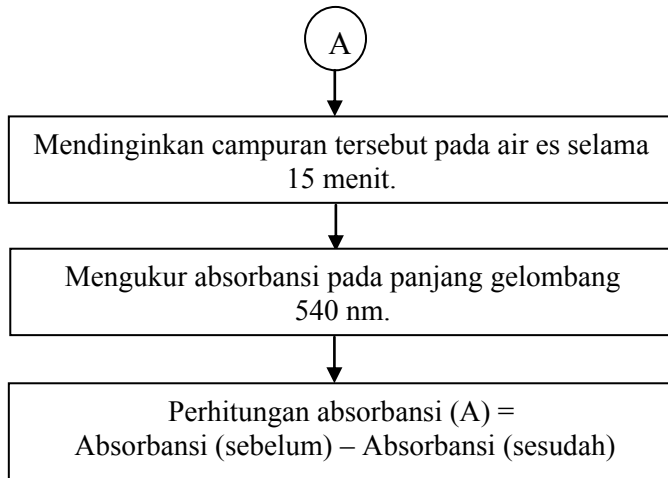


**2. Prosedur uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase sebelum di koreksi (Widjaja, 2009)**



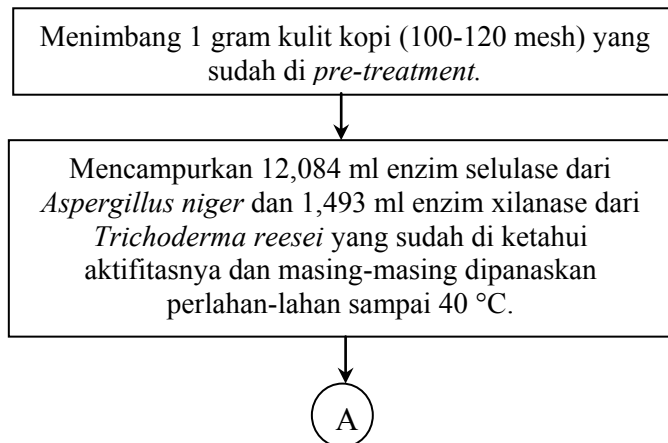
**3. Prosedur uji aktifitas enzim selulase dan enzim xilanase untuk larutan koreksi :**

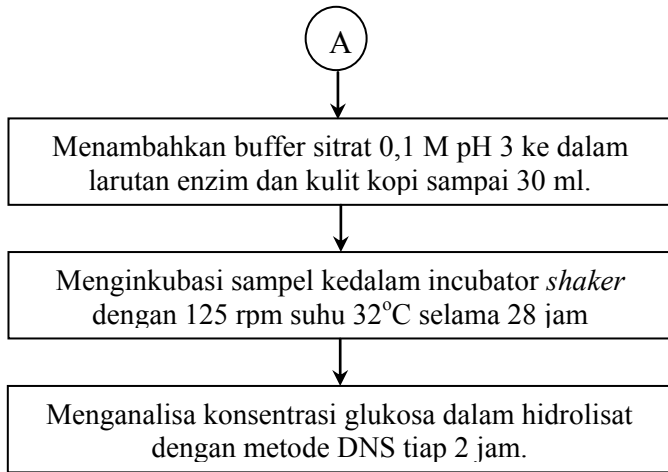




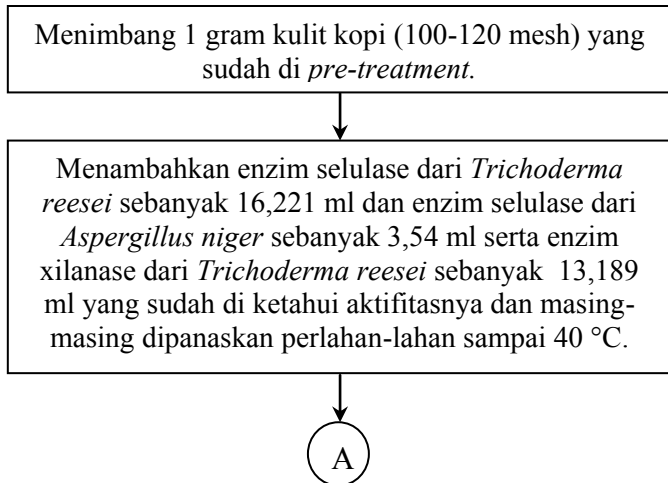
#### III.7.4 Tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa oleh enzim selulase dan enzim xylanase

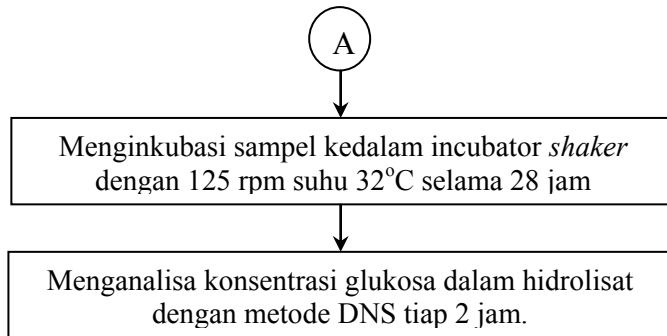
##### A. *Prosedur hidrolisis kulit kopi menggunakan enzim murni (Anwar, 2008)*



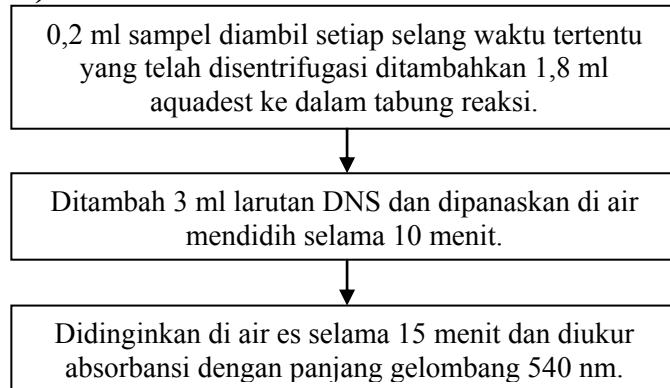


**B. Prosedur hidrolisis kulit kopi menggunakan crude enzim (Anwar, 2008)**

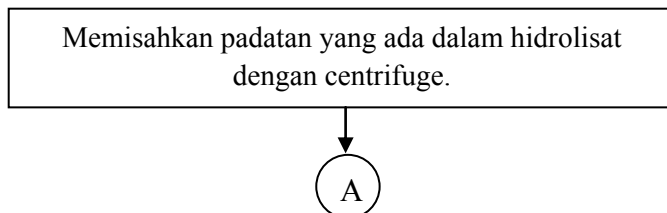


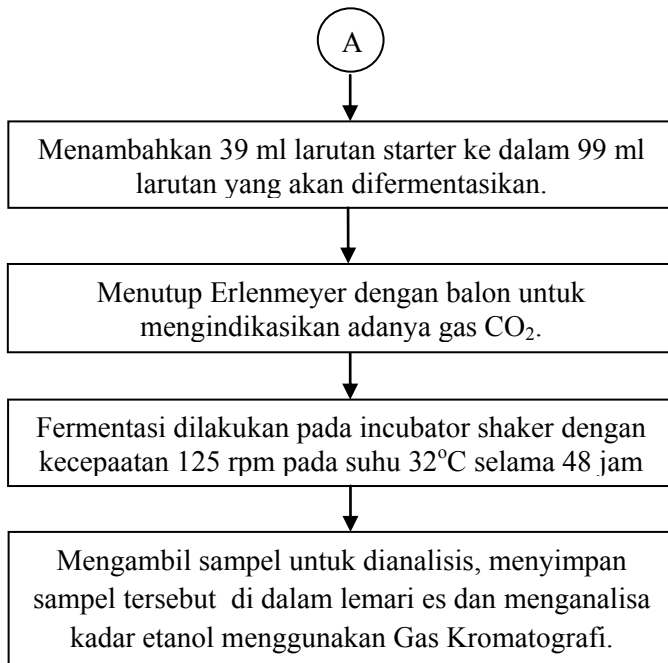


**C. *Prosedur analisa konsentrasi glukosa dan xilosa*(Miller, 1959):**



**III.7.5 Tahap fermentasi hidrolisat kulit kopi**





### III.8 Rencana Jadwal Kegiatan Penelitian

**Tabel III.1** Rencana Jadwal Kegiatan Penelitian

No	Kegiatan	Minggu ke - (Tahun 2015)																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	20	21	22	23	24	
1	Studi Literatur																								
2	Pelaksanaan Penelitian																								
3	Progress Report																								
4	Penyusunan Laporan																								

***“Halaman ini sengaja dikosongkan”***



## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan bioetanol dari kulit buah kopi melalui proses *pretreatment*, hidrolisis secara enzimatik, dan fermentasi. Dalam penelitian untuk menghasilkan bioetanol terdapat beberapa tahapan proses yang harus dilakukan yaitu:

Tahap I: Tahap *pretreatment* kulit buah kopi

Pada tahap I, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. Tahap *pretreatment* mekanik (*Douglas, 1988*)

B. Tahap *pretreatment* kimiawi (*Mosier, 2004*)

C. Tahap pengujian kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa

Tahap II: Tahap produksi crude enzim selulase dan crude enzim xilanase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei*.

Pada tahap II, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. Tahap pembiakan jamur (*T. reesei* dan *A. niger*)

B. Tahap pembuatan media fermentasi untuk produksi enzim selulase dan enzim xilanase

C. Tahap pembuatan crude enzim

Tahap III: Tahap hidrolisis selulosa dan hemiselulosa pada kulit kopi menjadi glukosa dan xylosa oleh campuran enzim selulase dan xilanase.

Pada tahap III, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. *Pure enzyme*

B. *Crude enzyme*

C. Tahap pengujian konsentrasi gula reduksi

Tahap IV: Tahap fermentasi hidrolisat kulit kopi menjadi etanol oleh variasi mikroorganisme *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*.

Pada tahap IV, penelitian dibagi menjadi tiga tahapan :

A. Analisa jumlah sel

B. Pengaruh Jenis Mikroorganisme terhadap Performa Fermentasi

- C. Fermentasi kulit kopi menjadi etanol dengan *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*

#### **IV.1 Pretreatment Kulit Buah Kopi**

Proses *pretreatment* kulit buah kopi pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara, yaitu secara mekanik dan kimiawi dengan menggunakan metode organosolv dan tujuan dari *pretreatment* adalah membuka struktur lignoselulosa agar selulosa atau hemiselulosa lebih mudah untuk didegradasi oleh enzim.

##### **IV.1.1 Pretreatment Mekanik**

Hal pertama yang dilakukan dalam proses *pretreatment* mekanik. Kulit buah kopi dikeringkan di bawah sinar matahari. Hal ini bertujuan untuk menghindari terjadinya pembusukan pada kulit buah kopi, sehingga kulit buah kopi menjadi tahan dalam jangka waktu yang lama. Selanjutnya kulit buah kopi yang sudah dijemur, digiling dengan mesin penggiling. Langkah terakhir pada proses *pretreatment* mekanik ini adalah kulit buah kopi diayak sampai diperoleh ukuran sebesar 100-120 mesh. Proses pengayakan kulit buah kopi sampai diperoleh ukuran 100-120 mesh ini bertujuan agar dapat mempermudah pada proses enzimatik oleh enzim selulase dan xilanase. Ukuran yang kecil (100-120 mesh) akan memperluas permukaan kontak antara enzim dengan kulit buah kopi sehingga enzim dapat dengan mudah mendegradasi selulosa dan hemiselulosa yang terkandung dalam kulit buah kopi menjadi glukosa. Dalam penelitian sebelumnya ukuran optimum untuk proses degradasi diperoleh pada ukuran 100-120 mesh (Anwar *et al.*, 2011).

##### **IV.1.2 Pretreatment Kimiawi**

*Pretreatment* kulit buah kopi secara kimiawi bertujuan untuk menghilangkan kadar lignin karena struktur lignin pada kulit buah kopi bersifat kokoh sehingga dapat menghalangi kinerja enzim dalam mendegradasi selulosa dan hemiselulosa. Dengan rusaknya struktur lignin, selulosa dan hemiselulosa yang

terkandung dalam lignoselulosa akan lebih mudah diakses oleh enzim sehingga proses hidrolisisnya akan berjalan lebih mudah, sehingga akan dihasilkan gula reduksi yang lebih besar jumlahnya (*Asgher et al.,2013*).

Komposisi kimia kulit buah kopi sebelum dilakukan pretreatment ditunjukkan pada Tabel IV.1.

**Tabel IV.1** Komposisi Kimia Kulit buah kopi tanpa pretreatment

Variabel	Komposisi kimia	% wt
Sebelum pretreatment	Selulosa	63
	Hemiselulosa	2,3
	Lignin	17

(*Grisel et al.,2013*)

Pada Tabel IV.1 Kulit buah kopi mempunyai komposisi kimia 63% selulosa, 2,3% hemiselulosa dan 17% lignin. Dalam penelitian BPKI yang telah dilakukan didapatkan komposisi kimia kulit buah kopi terdiri dari 47,6% selulosa, 6,38% hemiselulosa, 6,81% lignin. Dari data kulit buah kopi mempunyai kandungan selulosa dan hemiselulosa yang dapat dikembangkan menjadi bahan baku untuk pembuatan etanol.

#### **IV.1.2.1 Pretreatment Kulit Buah Kopi dengan Metode Organosolv**

Dalam *pretreatment* kimiawi ini, larutan yang digunakan adalah larutan etanol dengan variasi konsentrasi 10% sampai 50%. Memasukkan kulit kopi 25 gram ke dalam reaktor berpengaduk lalu ditambahkan dengan asam sitrat 400 gram (perbandingan 1:16) dengan menambahkan NaOH sampai pH 3. Pengadukan dilakukan dengan kecepatan 600 rpm dengan suhu 80°C selama 75 menit. Penambahan asam sitrat bertujuan untuk mengurangi kandungan pektin yang ada pada kulit kopi. Lalu padatan dipisahkan dari larutannya untuk dilakukan proses delignifikasi. Lalu menambahkan etanol dengan konsentrasi 10%

sampai 50% dengan kecepatan pengadukan 500 rpm pada suhu 50°C selama 2 jam. Etanol sebagai pelarut organik yang digunakan untuk menurunkan kandungan lignin. Setelah itu disaring untuk diambil padatnya, lalu dioven pada suhu 60°C sampai berat konstan dan dihaluskan.

**Tabel IV.2** Perubahan Massa Akhir Kulit buah kopi setelah *Pretreatment* secara Kimiawi dengan metode Organosolv

No.	Variabel	Massa (gr)	Kandungan Lignoselulosa					
			Selulase		Hemiselulase		Lignin	
			w/w %	gr	w/w %	gr	w/w %	gr
1.	Bahan baku	25	47,6	11,9	6,38	1,59	6,81	1,70
2.	Etanol 10%	14,59	46,88	6,83	6,44	0,94	1,23	0,18
3.	Etanol 20%	19,95	48,15	9,61	9,16	1,83	0,51	0,10
4.	Etanol 30%	16,08	51,05	8,21	11,05	1,78	0,22	0,04
5.	Etanol 40%	20,13	47,98	9,66	5,16	1,04	1,32	0,27
6.	Etanol 50%	19,79	52,24	10,3	11,48	2,27	0,2	0,035

No.	Variabel	Perubahan massa (gr)= massa bahan baku- massa setelah <i>pretreatment</i>		
		Selulase	Hemiselulase	Lignin
1.	Bahan baku	-	-	-
2.	Etanol 10%	5,08	0,66	1,52
3.	Etanol 20%	2,29	0,23	1,60

4.	Etanol 30%	3,69	0,18	1,68
5.	Etanol 40%	2,24	0,56	1,44
6.	Etanol 50%	1,56	0,68	1,66

No	Variabel	Perubahan massa (gr)= massa bahan baku- massa setelah <i>pretreatment</i>		
		Selulase	Hemiselulase	Lignin
1.	Bahan baku	-	-	-
2.	Etanol 10%	5,08	0,66	1,52
3.	Etanol 20%	2,29	0,23	1,60
4.	Etanol 30%	3,69	0,18	1,68
5.	Etanol 40%	2,24	0,56	1,44
6.	Etanol 50%	1,56	0,68	1,66

Pada Tabel IV.2 massa kulit buah kopi yang tereduksi setelah dilakukan *pretreatment* dengan metode organosolv yang menggunakan etanol. Etanol digunakan sebagai pelarut organik untuk menurunkan kandungan lignin pada kulit kopi. Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa lignin dari bahan baku sebesar 1,7 gr dalam kulit kopi dan mengalami penurunan kandungan lignin dari setiap variasi etanol. Hasil terbaik dari *pretreatment* etanol 50% memiliki kandungan lignin sebesar 0,035 gr. Massa lignin yang hilang sebesar 1,66 gr. Sehingga semakin besar konsentrasi pelarut organik (etanol) maka semakin besar massa lignin yang hilang. Dimana, hilangnya massa lignin merupakan tanda telah rusaknya struktur lignin dan rusaknya struktur lignin tersebut mampu meningkatkan kadar selulosa di dalam kulit kopi untuk hidrolisis enzim. Namun, berdasarkan literatur yang ada, proses organosolv juga mampu melarutkan sebagian besar hemiselulosa

(Mesa et al.,2010). Disamping itu, dengan pencucian air, kulit buah kopi yang telah dilakukan *pretreatment* organosolv akan memiliki pH netral serta Lignin, hemiselulosa dan selulosa yang terlarut juga ikut lolos terbuang ketika disaring. Hal ini yang menyebabkan massa dari kulit buah kopi berkurang setelah dilakukan *pretreatment*.

Kemudian dilakukan analisa dengan metode *Chesson* (Datta et al.,1981) untuk mendapatkan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin pada kulit buah kopi. Dalam metode *Chesson* ini, digunakan  $H_2SO_4$  1 N untuk melarutkan hemiselulosa sedangkan  $H_2SO_4$  72 % +  $H_2SO_4$  1 N untuk melarutkan selulosa. Pada metode *Chesson*, setelah sampel direfluks menggunakan  $H_2O$ , sampel direfluks dalam  $H_2SO_4$  1 N. Dalam proses ini yang terjadi adalah pelarutan hemiselulosa yang terdapat pada sampel sehingga berat akhir sampel dari proses ini adalah berat sampel yang telah kehilangan hemiselulosa. Kemudian proses selanjutnya sampel direndam dalam  $H_2SO_4$  72% kemudian ditambah  $H_2SO_4$  1 N dan direflux kembali, pada proses ini yang terjadi adalah pelarutan selulosa sehingga berat sampel pada proses ini adalah berat sampel yang telah kehilangan hemiselulosa dan selulosa. Kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin pada kulit buah kopi berdasarkan hasil analisa dengan Metode *Chesson* ditunjukkan pada Tabel IV.3.

**Tabel IV.3** Komposisi kimia kulit buah kopi sebelum dan sesudah *Pretreatment* Metode Organosolv

No	Variabel	Selulosa	Hemiselulosa	Lignin	Lainnya
1	Tanpa <i>Pretreatment</i>	47,6	6,38	6,81	39,21
2	Etanol 10 %	46,88	6,44	1,23	45,44
3	Etanol 20 %	48,15	9,16	0,51	42,18
4	Etanol 30 %	51,05	11,05	0,22	37,68

5	Etanol 40 %	47,98	5,16	1,32	45,54
6	Etanol 50 %	52,24	11,48	0,2	36,08

Dari Tabel IV.3 dapat diperoleh bahwa variabel terbaik diperoleh pada konsentrasi etanol 50%, yaitu dengan adanya kenaikan konsentrasi selulosa dan hemiselulosa berturut-turut sebesar 52,24%wt dan 11,48%wt dan lignin mengalami penurunan paling rendah menjadi 0,2%wt. Semakin besar konsentrasi etanol maka semakin besar pula penurunan lignin dan juga meningkatkan kandungan selulosa dan hemiselulosa dalam kulit kopi. Semakin besar konsentrasi etanol maka nilai  $\alpha$  selulosa dan hemiselulosa semakin besar. Kenaikan tersebut karena lignin sebagai pengikat selulosa akan terpisah sehingga  $\alpha$  selulosa dan hemiselulosa semakin besar. Faktor-faktor lain yang mempengaruhi proses delignifikasi ini adalah: waktu pemasakan, konsentrasi larutan pemasak, pencampuran bahan, perbandingan larutan pemasak dengan bahan baku, ukuran bahan, suhu dan tekanan serta konsentrasi katalis (Enny *et al.*, 2009). Penghilangan lignin sangat dipengaruhi oleh kenaikan suhu 150-180<sup>0</sup>C sehingga meningkatkan pula lignin yang dihilangkan dan sebagian kecil hemiselulosa juga ikut terdegradasi serta kadar selulosa yang dihasilkan sangat maksimal (Hamid *et al.*, 2014).

## IV. 2 Produksi Crude Enzim Selulase dan Crude Enzim

### **Xilanase dari *Aspergillus Niger* dan *Trichoderma Ressei*.**

Sebelum dilakukan hidrolisis kulit buah kopi perlu dilakukan beberapa tahapan persiapan. Tahapan yang harus dilakukan yaitu:

1. Penyiapan dan pembuatan larutan enzim selulase dan xilanase murni.
2. Penyiapan dan pembuatan larutan *crude enzyme* dari jamur *Trichoderma reseei* dan *Aspergillus niger*.

#### IV.2.1 Penyiapan dan Pembuatan Larutan Enzim Selulase dan Xilanase Murni

Enzim yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim selulase murni dari *Aspergillus niger* dan xilanase murni dari *Trichoderma longibrachiatum*. Untuk mendapatkan aktifitas enzim selulase dan xilanase perlu dipersiapkan kurva standar glukosa dan xilosa. Dari absorbansi yang didapatkan kemudian dibuat kurva kalibrasi antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa dan xilosa, sehingga didapatkan kurva standar glukosa dan xilosa untuk menguji keaktifan enzim selulase dan xilanase. Hasilnya ditunjukkan pada Tabel IV.4 dan IV.5.

**Tabel IV.4** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase

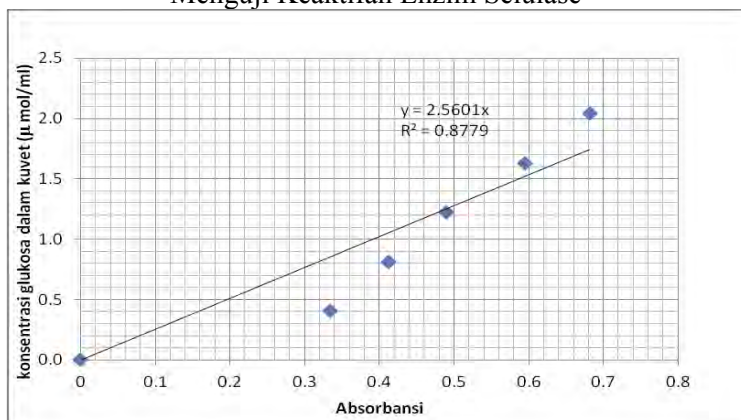
Larutan Glukosa 0.02 M (mL)	Buffer (mL)	Diambil (mL)	CMC (mL)	V total (mL)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/mL}$ )		Absorbansi
					Di tabung 1)	Di kuvet 2)	
0	5	0,2	1,8	5	0,000	0,000	0
1	4	0,2	1,8	5	4,078	0,408	0,334
2	3	0,2	1,8	5	8,156	0,816	0,413
3	2	0,2	1,8	5	12,233	1,223	0,489
4	1	0,2	1,8	5	16,311	1,631	0,596
5	0	0,2	1,8	5	20,389	2,039	0,682

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan glukosa dan buffer sitrat

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan CMC dan DNS



**Gambar IV.1** Kurva Standar Glukosa (dengan CMC) untuk Menguji Keaktifan Enzim Selulase



Seperti pada enzim selulase, diperlukan juga kurva standar xilosa untuk mengukur aktivitas enzim xilanase. Berikut ini data absorbansi xilosa untuk mengukur aktivitas enzim xilanase.

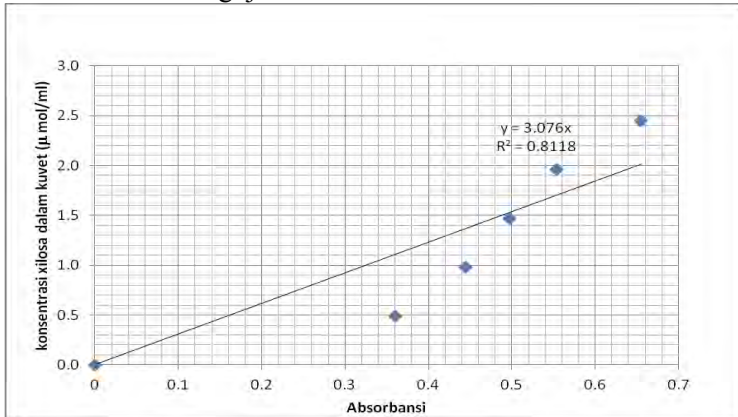
**Tabel IV.5** Perhitungan Kurva Standar Xilosa (dengan Xylan) Untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase

Larutan xilosa 0.024 M (mL)	Buffer (mL)	Diambil (mL)	Xilan (mL)	V total (mL)	Konsentrasi (μmol/ml)		Absorbansi
					Di tabung <sup>1)</sup>	Di kuvet <sup>2)</sup>	
0	5	0,2	1,8	5	0,000	0,00	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,897	0,49	0,360
2	3	0,2	1,8	5	9,794	0,97	0,445
3	2	0,2	1,8	5	14,69	1,46	0,497
4	1	0,2	1,8	5	19,58	1,95	0,554
5	0	0,2	1,8	5	24,48	2,44	0,655

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan glukosa dan buffer sitrat

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan xylan dan DNS

**Gambar IV.2** Kurva Standar Xilosa (dengan Xylan) untuk Menguji Keaktifan Enzim Xilanase



Dari kurva standar glukosa dan xilosa yang telah didapat langkah selanjutnya adalah menguji keaktifan enzim. Keaktifan enzim diuji dengan metode DNS dan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang 540 nm. Kedua kurva di atas (Gambar IV.1 dan Gambar IV.2) diperoleh dari larutan glukosa dan xilosa yang dicampur masing-masing dengan *Carboxymetil Cellulose* (CMC) dan xilan. CMC digunakan karena CMC dapat dihidrolisis oleh enzim selulase sehingga dihasilkan glukosa, sedangkan xilan dihidrolisis oleh enzim xilanase menjadi xilosa. Dari hal tersebut, dapat diketahui bagaimana dan berapa aktivitas enzim tersebut. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur absorbansi dari enzim selulase dan xilanase adalah 540 nm. Karena pada  $\lambda$  tersebut, reaksi gula reduksi dengan reagen *Dinitrosalicylic Acid* (DNS) akan menghasilkan warna merah atau jingga setelah dipanaskan dan didinginkan sehingga dapat terbaca absorbansinya oleh gelombang 540 nm. Namun, pada gambar IV.1 dan gambar IV.2 dalam penelitian ini, didekati dengan menggunakan kurva linier tetapi akan lebih baik jika

menggunakan kurva polynomial orde 2. Dengan menggunakan kurva polynomial didapat kebutuhan enzim xilosa sebesar 45,6325 U/ml. Hal ini sangat berbeda jauh jika menggunakan kurva linier dengan error sebesar 0,73.

Satu Unit (1U) aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghasilkan satu  $\mu\text{mol}$  gula reduksi per menit. Hasil pengukuran aktivitas enzim selulase murni dari *Aspergillus niger* dan xilanase murni dari *Trichoderma longibrachiatum*. ditunjukkan pada Tabel IV.6

**Tabel IV.6** Pengukuran Aktivitas Enzim Selulase dan Enzim Xilanase

Enzim	Absorbansi(A)			Slope	Aktivitas (U/mL)
	(A <sub>1</sub> )	(A <sub>2</sub> )	(A <sub>1</sub> -A <sub>2</sub> )		
<i>Selulase</i>	0,9575	0,7170	0,2405	2,560	1,5392
<i>Xilanase</i>	2,1050	0,4850	1,62	3,076	12,4578

**Keterangan** : A<sub>1</sub> : Absorbansi larutan sebelum koreksi  
A<sub>2</sub> : Absorbansi larutan setelah koreksi  
Aktivitas enzim = (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) x slope kurva standar gula reduksi

Dari Tabel IV.6, dapat diperoleh aktifitas enzim selulase dan xilanase murni dengan perhitungan sebagai berikut :

- Aktifitas enzim selulase =  

$$\frac{(A_1 - A_2) \times \text{slope kurva} \times V \text{ sampel (5 ml)}}{\text{waktu inkubasi} \times V \text{ enzim (ml)}}$$

$$= \frac{(0,9575 - 0,717) \times 2,560 \times 5 \text{ ml}}{10 \text{ menit} \times 0,2 \text{ ml}} = 1,5392 \text{ U/mL}$$
- Aktifitas enzim xilanase =  

$$\frac{(A_1 - A_2) \times \text{slope kurva} \times V \text{ sampel (5ml)}}{\text{waktu inkubasi} \times V \text{ enzim (ml)}}$$

$$= \frac{(2,105 - 0,485) \times 3,076 \times 5 \text{ ml}}{10 \text{ menit} \times 0,2 \text{ ml}} = 12,4578 \text{ U/mL}$$

Dari hasil perhitungan aktivitas enzim tersebut, kemudian dilakukan perhitungan untuk kebutuhan enzim Campuran Selulase dan Xylanase. Konsentrasi enzim yang digunakan dalam hidrolisis adalah 18,6 U enzim selulase murni dan 18,6 U enzim xylanase murni / 1 gr kulit buah kopi, sehingga:

$$\begin{aligned}\text{Kebutuhan enzim campuran} &= \text{Kebutuhan (enzim xylanase +} \\ &\quad \text{enzim selulase)} \\ &= 1,493 \text{ mL enzim xylanase} + \\ &\quad 12,084 \text{ mL enzim selulase} \\ &= 13,577 \text{ ml}\end{aligned}$$

#### **IV.2.2 Penyiapan dan Pembuatan Larutan *Crude Enzyme* dari Jamur *Trichoderma Reesei* dan *Aspergillus Niger*.**

Dari hasil perhitungan aktivitas enzim tersebut, dapat dilakukan perhitungan untuk kebutuhan enzim dalam penelitian ini. Dari perhitungan didapat kebutuhan enzim untuk masing-masing variabel pada Tabel IV.7.

Pada prosedur untuk tahap hidrolisis, ditetapkan untuk konsentrasi enzim yang digunakan sebesar 18,6 U/gram kulit buah kopi maka larutan total enzim beserta buffer sitrat pH 3 yang digunakan pada hidrolisis adalah 30 ml. Namun karena aktivitas *crude enzyme* yang relatif rendah maka volume larutan menjadi semakin besar. Hal ini dapat dilihat pada tabel IV.9 yang berdasarkan aktivitas *crude enzyme* maka total kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* selulase (2T:1A) membutuhkan masing-masing enzim sebanyak 32,95 ml. Oleh karena itu untuk kedua variabel tersebut tanpa diberikan tambahan buffer sitrat pH 3.

**Tabel IV.7** Kebutuhan Enzim pada Setiap Variabel Enzim untuk Hidrolisis

Variabel	Komposisi	Aktivitas	Kebutuhan	Total
Enzim	Enzim	Enzim	Enzim (ml)	Volume (ml)
Crude enzyme 2 Selulase (2T:1A) : 1 Xilanase	<i>Crude enzyme T. reesei</i> Substrat Jerami Padi	0,678	12,19	40,3
	<i>Crude enzyme A. niger</i> Substrat Jerami Padi	0,518	7,98	
	<i>Crude enzyme T. reesei</i> Substrat Dedak Gandum	0,308	20,13	

### IV.3 Hidrolisis Kulit Buah Kopi

Pada proses hidrolisis kulit buah kopi dibagi menjadi tiga tahapan :

1. *Pure enzyme*
2. *Crude enzyme*
3. Tahap pengujian konsentrasi gula reduksi

#### IV.3.1 Hidrolisis Kulit Buah Kopi dengan Enzim Murni Campuran Selulase dan Xilanase

Dalam hidrolisis kulit buah kopi ini yang perlu dipersiapkan pertama kali yaitu kurva standar glukosa yang berfungsi untuk menguji konsentrasi glukosa pada saat proses hidrolisis berlangsung. Dalam pembuatan kurva ini, tidak digunakan *Carboxymetil Cellulose* (CMC), tetapi hanya menggunakan aquades. Hal ini dikarenakan CMC hanya diperlukan untuk mengetahui aktivitas enzim.

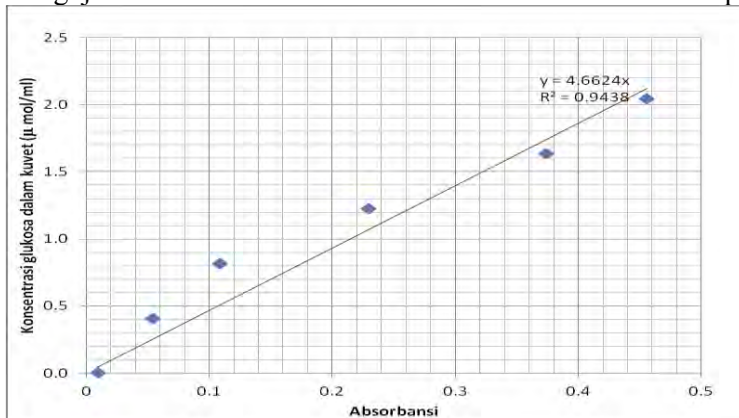
**Tabel IV.8** Perhitungan Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Kulit buah kopi

Larutan xilosa 0.024 M (mL)	Buffer (mL)	Diambil (mL)	Aquadest (mL)	V total (mL)	Konsentrasi ( $\mu\text{mol/ml}$ ) Di tabung <sup>1)</sup>	Konsentrasi Di kuvet <sup>2)</sup>	Absorbansi
0	5	0,2	1,8	5	0,000	0,00	0,000
1	4	0,2	1,8	5	4,084	0,408	0,054
2	3	0,2	1,8	5	8,169	0,817	0,109
3	2	0,2	1,8	5	12,253	1,225	0,229
4	1	0,2	1,8	5	16,338	1,634	0,374
5	0	0,2	1,8	5	20,422	2,042	0,456

<sup>1)</sup>Konsentrasi larutan glukosa dan buffer sitrat

<sup>2)</sup>Konsentrasi larutan setelah penambahan xylan dan DNS

**Gambar IV.3** Kurva Standar Glukosa (Tanpa CMC) untuk Menguji Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Kulit Buah Kopi



Kondisi operasi dari proses hidrolisis adalah pada temperatur 60 °C dan pH 3, selama 30 jam. Suhu 60°C dijaga konstan dengan menggunakan inkubator shaker. Kondisi operasi ini ditetapkan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya bahwa aktivitas enzim akan optimum pada suhu tinggi dengan pH rendah (Anwar et al., 2011)

Setelah diketahui kebutuhan enzimnya, maka ke dalam Erlenmeyer 100 ml yang telah berisi campuran enzim dan 1 gram kulit buah kopi, ditambahkan buffer sitrat 0,1 M pH 3 sampai volume 30 ml. Setelah tercampur, pH dicek dengan menggunakan kertas indikator, untuk memastikan bahwa pH larutannya adalah 3. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam inkubator shaker yang suhunya telah diatur menjadi 60°C, dan dishaker dengan kecepatan 125 rpm.

Analisa konsentrasi glukosa dalam hidrolisat dengan metode DNS dilakukan pada setiap sampel pada setiap selang waktu tertentu. Sampel diambil dengan pipet tetes, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk merusak enzim yang terdapat dalam sampel, agar tidak terjadi proses hidrolisis lebih lanjut selama proses analisa DNS. Untuk selanjutnya, sampel yang telah dipanaskan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan sebesar 10.000 rpm pada alat sentrifugal. Hal ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan dan cairan pada hidrolisat, karena dibutuhkan hasil sentrifugasi (liquid) yang murni yang akan dianalisa dengan metode DNS. 0,2 ml larutan setiap sampel hasil sentrifugasi (liquid) ditambah 1,8 ml aquadest dan DNS sebanyak 3 ml, lalu divortex supaya larutan menjadi homogen. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan di air mendidih selama 10 menit, selanjutnya didinginkan di air es selama 10 menit, dan selanjutnya didiamkan dalam air bersuhu kamar selama 10 menit. Pada penelitian ini telah dilakukan delapan proses hidrolisis, untuk membandingkan pengaruh berbagai konsentrasi pelarut yang digunakan pada

proses pretreatment Organosolv terhadap hasil gula reduksi yang diperoleh. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan, diperoleh hasil pada Tabel IV.9.

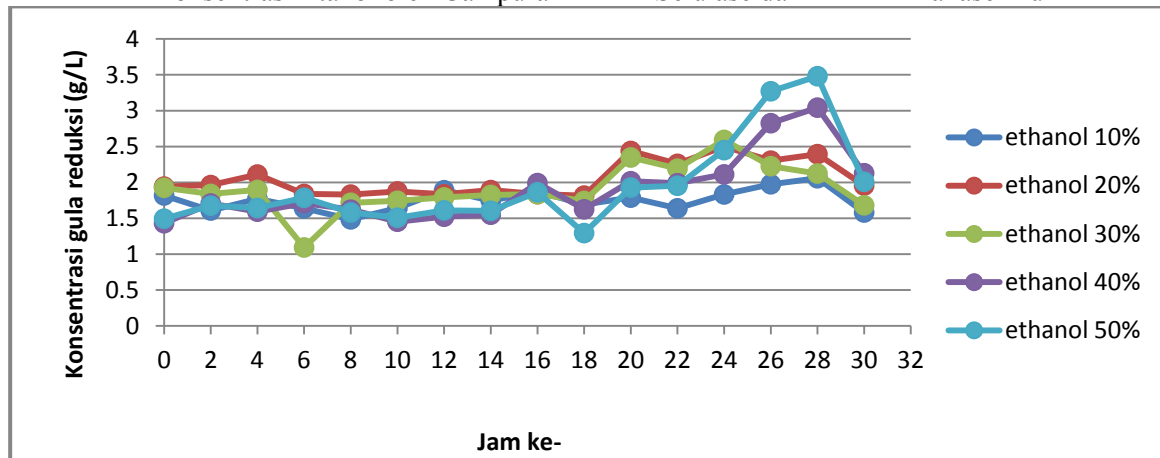


**Tabel IV.9** Data Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Kulit buah kopi oleh campuran Enzim Selulase dan Enzim Xilanase Murni

Jam ke-	No Pretreatment		Etanol 10% Pretreatment		Etanol 20% Pretreatment		Etanol 30% Pretreatment		Etanol 40% Pretreatment		Etanol 50% Pretreatment	
	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)
0	0,036	0,168	0,390	1,818	0,417	1,942	0,413	1,926	0,307	1,431	0,321	1,494
2	0,081	0,378	0,345	1,609	0,421	1,963	0,395	1,839	0,366	1,706	0,359	1,676
4	0,046	0,215	0,380	1,771	0,453	2,109	0,407	1,895	0,342	1,592	0,353	1,643
6	0,075	0,348	0,352	1,639	0,395	1,839	0,235	1,093	0,367	1,711	0,383	1,786
8	0,108	0,502	0,319	1,485	0,393	1,829	0,368	1,716	0,348	1,620	0,339	1,581
10	0,074	0,345	0,352	1,641	0,402	1,874	0,374	1,744	0,312	1,452	0,324	1,508
12	0,052	0,024	0,406	1,891	0,394	1,835	0,384	1,790	0,327	1,522	0,346	1,611
14	0,052	0,024	0,375	1,746	0,406	1,893	0,392	1,825	0,333	1,550	0,344	1,604
16	0,048	0,222	0,402	1,872	0,394	1,837	0,394	1,837	0,427	1,991	0,399	1,863
18	0,063	0,294	0,363	1,692	0,389	1,816	0,374	1,741	0,349	1,625	0,278	1,294
20	0,043	0,199	0,384	1,788	0,523	2,438	0,504	2,348	0,433	2,016	0,414	1,928
22	0,075	0,348	0,352	1,639	0,485	2,259	0,470	2,191	0,427	1,988	0,419	1,954

24	0,039	0,182	0,393	1,832	0,537	2,501	0,556	2,592	0,453	2,112	0,526	2,450
26	0,069	0,325	0,424	1,975	0,494	2,303	0,478	2,226	0,606	2,825	0,702	3,271
28	0,088	0,408	0,442	2,058	0,514	2,394	0,456	2,123	0,653	3,042	0,747	3,480
30	0,072	0,036	0,392	1,581	0,419	1,956	0,361	1,681	0,457	2,128	0,431	2,009

**Gambar IV.4** Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Kulit buah kopi berbagai Konsentrasi Etanol oleh Campuran Enzim Selulase dan Enzim Xilanase Murni



Dari Gambar IV.4 terlihat bahwa nilai absorbansi dan glukosa cenderung mengalami peningkatan selama waktu hidrolisis. Pada pretreatment organosolv dengan konsentrasi etanol 50% memiliki kecenderungan peningkatan paling besar untuk menghasilkan gula reduksi yang berarti enzim yang digunakan mampu menghidrolisis kulit buah kopi. Konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan yaitu sebesar 3,48 gr/L pada jam ke-28 dan mengalami penurunan konsentrasi gula reduksi pada jam ke-30 sebesar 2,009 g/L. Semakin besar konsentrasi etanol maka jumlah lignin yang terdegradasi juga semakin banyak. Berkurangnya lignin ini memudahkan enzim dalam mendegradasi selulosa maupun hemiselulosa untuk dihidrolisis menjadi gula reduksi. Hal ini juga ditunjukkan oleh hasil analisa kadar lignin pada Tabel IV.3 dimana kadar lignin pada kulit buah kopi organosolv treated mengalami penurunan ketika konsentrasi etanol yang semakin besar.

#### **IV.3.2 Hidrolisis Kulit Buah Kopi dengan Campuran Crude Enzim Selulase dan Xilanase**

Analisa konsentrasi glukosa dalam hidrolisat dengan metode DNS dilakukan pada setiap sampel pada setiap selang waktu tertentu. Sampel diambil dengan pipet tetes, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 2 menit. Pemanasan ini bertujuan untuk merusak enzim yang terdapat dalam sampel, agar tidak terjadi proses hidrolisis lebih lanjut selama proses analisa DNS. Untuk selanjutnya, sampel yang telah dipanaskan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan sebesar 10.000 rpm pada alat sentrifugal. Hal ini bertujuan untuk memisahkan antara padatan dan cairan pada hidrolisat, karena dibutuhkan hasil sentrifugasi (liquid) yang murni yang akan dianalisa dengan metode DNS. 0,2 ml larutan setiap sampel hasil sentrifugasi (liquid) ditambah 1,8 ml aquadest dan DNS sebanyak 3 ml, lalu divortex supaya larutan menjadi homogen. Selanjutnya, larutan tersebut dipanaskan di air mendidih selama 10 menit, selanjutnya

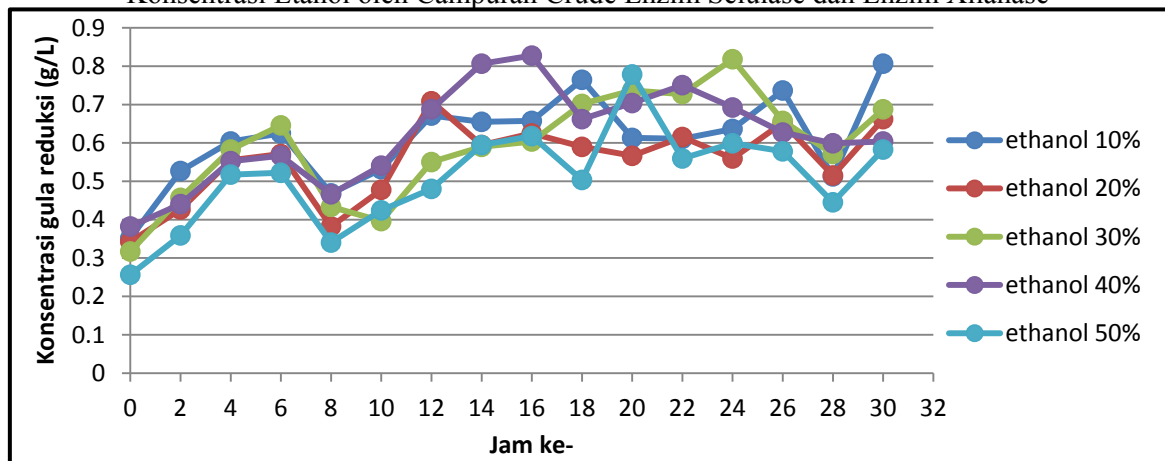
didinginkan di air es selama 10 menit, dan selanjutnya didiamkan dalam air bersuhu kamar selama 10 menit. Pada penelitian ini telah dilakukan delapan proses hidrolisis, untuk membandingkan pengaruh berbagai waktu dan temperature pada proses pretreatment Organosolv terhadap hasil gula reduksi yang diperoleh. Berdasarkan analisa yang telah dilakukan, diperoleh hasil pada Tabel IV.10.

**Tabel IV.10** Data Analisa Gula Reduksi Hidrolisis Kulit buah kopi oleh Campuran  
Crude Enzim Selulase dan Enzim Xilanase

Jam ke-	No Pretreatment		Etanol 10% Pretreatment		Etanol 20% Pretreatment		Etanol 30% Pretreatment		Etanol 40% Pretreatment		Etanol 50% Pretreatment	
	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)	A	G (g/L)
0	0,036	0,168	0,076	0,352	0,074	0,343	0,068	0,317	0,082	0,382	0,055	0,256
2	0,073	0,341	0,113	0,527	0,092	0,427	0,098	0,457	0,095	0,441	0,077	0,359
4	0,090	0,420	0,129	0,604	0,119	0,555	0,125	0,583	0,119	0,552	0,111	0,518
6	0,095	0,441	0,134	0,625	0,123	0,571	0,139	0,646	0,122	0,566	0,112	0,522
8	0,061	0,285	0,101	0,469	0,082	0,382	0,093	0,434	0,100	0,466	0,073	0,340
10	0,075	0,348	0,114	0,532	0,103	0,478	0,085	0,396	0,116	0,541	0,091	0,424
12	0,105	0,488	0,114	0,671	0,152	0,709	0,118	0,550	0,148	0,688	0,103	0,480
14	0,101	0,471	0,141	0,655	0,128	0,595	0,127	0,589	0,173	0,807	0,128	0,594
16	0,102	0,474	0,141	0,657	0,134	0,625	0,129	0,604	0,178	0,828	0,133	0,618
18	0,125	0,581	0,164	0,765	0,127	0,589	0,151	0,702	0,142	0,662	0,108	0,504
20	0,092	0,429	0,132	0,613	0,122	0,566	0,269	0,737	0,151	0,704	0,167	0,779
22	0,092	0,427	0,131	0,611	0,132	0,615	0,289	0,727	0,161	0,751	0,120	0,559

24	0,097	0,453	0,137	0,636	0,120	0,559	0,281	0,818	0,149	0,692	0,129	0,599
26	0,119	0,553	0,158	0,737	0,140	0,653	0,271	0,657	0,135	0,627	0,124	0,578
28	0,071	0,329	0,110	0,513	0,111	0,515	0,123	0,571	0,128	0,599	0,096	0,445
30	0,134	0,623	0,173	0,807	0,142	0,662	0,148	0,688	0,129	0,604	0,125	0,583

**Gambar IV.5** Kurva Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi Hidrolisis Kulit buah kopi berbagai Konsentrasi Etanol oleh Campuran Crude Enzim Selulase dan Enzim Xilanase



Pada Tabel IV.10 dan Gambar IV.5 adalah hasil dari gula reduksi setelah dihidrolisis selama 30 jam menggunakan *crude* enzim selulase dan *crude* enzim xilanase dengan berbagai *pretreatment* organosolv konsentrasi etanol. Konsentrasi jumlah gula reduksi paling besar adalah 0,828 g/L dengan menggunakan konsentrasi etanol 40% pada jam ke-16 kemudian mengalami fluktuatif dan akhirnya menurun. Hal ini berarti bahwa enzim yang dihasilkan mampu menghidrolisis sampai jam ke-16 dan setelah itu enzim mulai terdenaturasi sehingga tidak mampu menghidrolisis substrat yang ada. Sedangkan konsentrasi etanol 50% gula reduksi terbesar didapatkan 0,779 g/L pada jam ke-20. Hasil yang didapat sangat berbeda jauh dengan hasil gula reduksi yang dihidrolisis dengan enzim murni. Hal ini dikarenakan komponen yang di dalam *crude* enzim tidak hanya selulase dan xilanase dan juga komponen tersebut bisa menjadi inhibitor bagi enzim xilanase dan selulase. Inhibitor merupakan zat yang mempunyai karakteristik hampir sama dengan enzim selulase dan xilanase.

*Pretreatment* sangat berpengaruh untuk menghasilkan konsentrasi gula reduksi, karena dapat mengurangi kandungan lignin atau meningkatkan komposisi selulosa dan hemiselulosa pada kulit buah kopi. Selulosa dan hemiselulosa dapat dikonversi menjadi gula reduksi. Hasil ini menunjukkan *pretreatment* paling efektif adalah dengan metode organosolv dengan konsentrasi etanol 50% dengan menggunakan hidrolisis enzim murni.

Pada keseluruhan variabel enzim, memiliki kecenderungan peningkatan konsentrasi gula reduksi, ini berarti enzim yang digunakan mampu menghidrolisis kulit buah kopi. Pada proses hidrolisis dengan penambahan campuran enzim selulase dan xilanase, menghasilkan gula reduksi yang lebih tinggi daripada hidrolisis dengan enzim selulase. Hal ini disebabkan karena proses hidrolisis yang terjadi berjalan lebih maksimal dengan adanya kombinasi antara enzim selulase dalam memecah selulosa

menjadi glukosa dan xilanase memecah hemiselulosa menjadi xilosa dalam kulit buah kopi.

Yield gula reduksi setelah *pretreatment* dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Yield gula reduksi} = \frac{\text{Konsentrasi gula reduksi} \times \text{Volume sampel}}{(\text{Hemiselulosa} + \text{Selulosa}) \times \text{Gram kulit kopi}} \times 100$$

Yield gula reduksi setelah *pretreatment* didefinisikan sebagai perbandingan jumlah gula reduksi yang dihasilkan selama hidrolisis 28 jam dengan gram selulosa dan hemiselulosa dalam 1 gram kulit buah kopi setelah dilakukan *pretreatment*, dalam hal ini hasil dari Chesson. Yield hasil hidrolisis ditunjukkan pada Tabel IV.11.



**Tabel IV.11** Yield hasil hidrolisis kulit buah kopi oleh enzim selulase berbagai konsentrasi  
*pretreatment*

<b>Metode Pretreatment</b>	<b>lignin (%)</b>	<b>selulosa (%)</b>	<b>hemiselulosa (%)</b>	<b>selu+hemi (%)</b>	<b>Hasil Gula Reduksi (g/L)</b>	<b>Volume hidrolisat (L)</b>	<b>Yield (g/g gula reduksi/selu+hemi)</b>
Raw material	6.81	47.6	6.38	53.98	0.408	0.03	0.023
NaOH	0.58	48.9	4.08	52.98	2.147	0.03	0.122
etanol 10%	1.23	46.88	6.44	53.32	2.058	0.03	0.116
etanol 20%	0.51	48.15	9.16	57.31	2.394	0.03	0.125
etanol 30%	0.22	51.05	11.05	62.1	2.124	0.03	0.103
etanol 40%	1.32	47.98	5.16	53.14	3.042	0.03	0.172
etanol 50%	0.2	52.24	11.48	63.72	3.480	0.03	0.164

#### **IV.4 Fermentasi Hidrolisat Kulit Kopi menjadi Etanol Oleh Variasi Mikroorganisme *Zymomonas Mobilis* Dan *Saccharomyces Sereviceae*.**

Pada proses hidrolisis kulit buah kopi dibagi menjadi tiga tahapan :

1. Analisa jumlah sel
2. Pengaruh Jenis Mikroorganisme terhadap Performa Fermentasi
3. Fermentasi kulit kopi menjadi etanol dengan *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces sereviceiae*

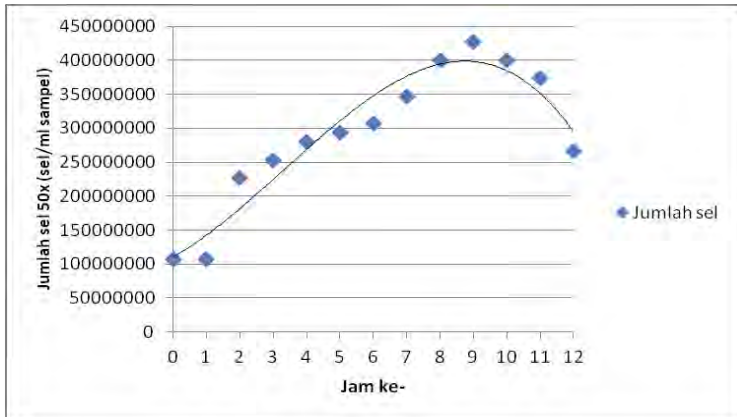
##### **IV.4.1 Analisa jumlah sel**

Pada proses fermentasi dilakukan analisa pertumbuhan bakteri dengan menggunakan metode *Counting Chamber* untuk mengetahui proses fermentasi berjalan dengan baik.

##### **IV.4.1.1 *Zymomonas mobilis* Termutasi A3**

*Zymomonas mobilis* termutasi A3 adalah *Zymomonas Mobilis* yang dimutasi dengan menggunakan larutan *hydroxylamine* sehingga dihasilkan *strain* yang memiliki morfologi lebih besar dengan gerakan yang lebih sedikit dibandingkan dengan *Z. Mobilis* biasa. Mutasi ini dilakukan untuk mendapatkan *strain Z.mobilis* yang memiliki karakter tahan pada kondisi asam. pH optimum untuk fermentasi menggunakan *Z.mobilis* termutasi adalah 4-5. Ciri-ciri bakteri *strain* ini antara lain tahan terhadap pH dibawah 5 dengan pH optimum 4,5, morfologi lebih besar dengan gerakan yang lebih sedikit, serta memiliki fase adaptasi kurang lebih 3 jam. Sehingga hal ini menjadi keuntungan tersendiri jika dibandingkan dengan *Zymomonas mobilis* biasa dalam proses produksi bioetanol. Berikut adalah grafik logaritmik pertumbuhan *Zymomonas mobilis* termutasi A3 (Putra dan Chrisnawati, 2008).

**Gambar IV.6** Grafik Pertumbuhan *Zymomonas Mobilis* Termutasi A3



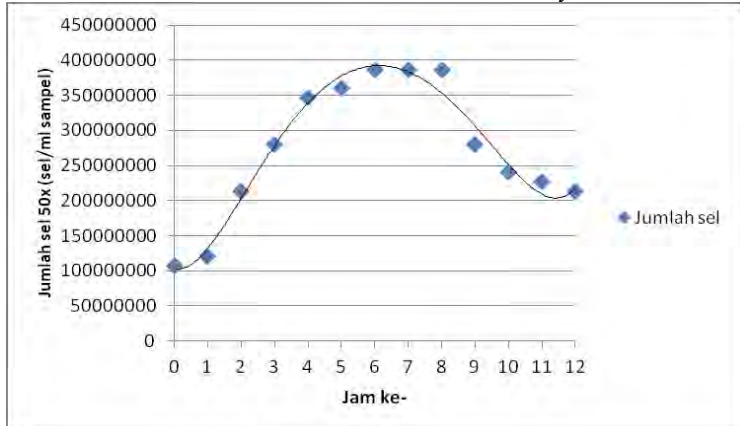
Dari gambar IV.6 terlihat bahwa mikroorganisme *Zymomonas Mobilis* Termutasi A3 mengalami *lag phase* pada jam ke- 0 menuju jam ke- 1, dimana pada jam tersebut tidak ada peningkatan jumlah sel yaitu sebesar 106666667 sel/mL, kondisi tetap tersebut dikarenakan mikroorganisme masih beradaptasi terhadap lingkungannya. Kemudian kembali tumbuh dari jam ke- 1 sebesar 106666667 sel/mL menuju jam ke- 9 sebesar 426666667 sel/mL, pada fase ini mikroorganisme mengalami kondisi *balance growth* atau disebut *log phase*. Dan mulai mengalami penurunan pada jam ke-10 hingga ke-12 menjadi 266666667 sel/mL.

Fase lag *Zymomonas mobilis* terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-4. Pada fase ini *Zymomonas mobilis* beradaptasi pada lingkungan medium yang baru sehingga pertumbuhannya berjalan lambat. Fase logaritmik terjadi pada kisaran jam ke-4 sampai jam ke-20. Pada fase ini pertumbuhan *Zymomonas mobilis* berlangsung paling cepat karena terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesis enzim dan sintesis senyawa lainnya (Ernes et al.,2014).

#### IV.4.1.2 *Saccharomyces Cerevisiae*

*Saccharomyces Cerevisiae* merupakan mikroorganisme bersel satu, tidak berklorofil, termasuk kelompok *Eumycetes*. Beberapa kelebihan *Saccharomyces Cerevisiae* dalam proses fermentasi adalah mikroorganisme ini cepat berkembang biak, tahan terhadap suhu yang tinggi, mempunyai sifat stabil dan cepat mengadakan adaptasi. Oleh karena itu dilakukan pemilihan mikroorganisme *Saccharomyces Cerevisiae*. Berikut merupakan kurva pertumbuhan untuk jenis mikroorganisme *Saccharomyces Cerevisiae*.

**Gambar IV.7** Grafik Pertumbuhan *Saccharomyces Cerevisiae*



Gambar IV.7 merupakan grafik pertumbuhan *Saccharomyces Cerevisiae*, diketahui bahwa *Saccharomyces Cerevisiae* mengalami peningkatan jumlah sel dari jam ke- 0 menuju jam ke- 6 menjadi 386666667 sel/mL, pada fase ini mikroorganisme mengalami kondisi *balance growth* atau disebut *log phase*. *Saccharomyces Cerevisiae* tumbuh konstan hingga jam ke- 8 menjadi 386666667 sel/mL.

Perbedaan antara kurva pertumbuhan *Zymomonas mobilis* dengan *Saccharomyces cerevisiae* terlihat bahwa *Saccharomyces cerevisiae* cepat mengalami kondisi *Log phase*. Hal tersebut disebabkan kemampuan adaptasi *Zymomonas*

*mobilis* yang lebih lambat dibandingkan *Saccharomyces cerevisiae*, karena *Zymomonas mobilis* mempunyai morfologi yang lebih besar dengan gerakan yang lebih pelan, menyebabkan kemampuan adaptasi dan proses metabolismenya juga menjadi lambat (Putra dan Chrisnawati, 2008).

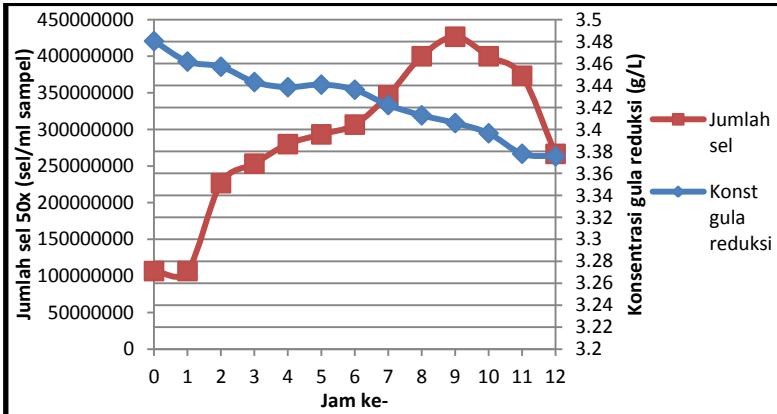
#### **IV.4.2 Pengaruh Jenis Mikroorganisme terhadap Performa Fermentasi**

Untuk mengetahui pengaruh jenis mikroorganisme terhadap performa proses fermentasi batch, dilakukan pembahasan yaitu dengan melihat perilaku atau performa mikroorganisme dalam mengkonversi gula menjadi etanol proses batch.

Pada hal ini diperlukan adanya analisa gula sisa atau gula residu dengan menggunakan metode DNS dimana metode ini adalah metode yang menggunakan reagen asam 3-5 dinitrosalisilat untuk mengetahui kandungan gula-gula pereduksi. DNS hanya mendeteksi glukosa dan fruktosa saja, tanpa menganalisa sukrosa. Hal ini dikarenakan sukrosa merupakan gula disakarida yang harus diubah menjadi gula monosakarida agar bisa dikonversi menjadi etanol.

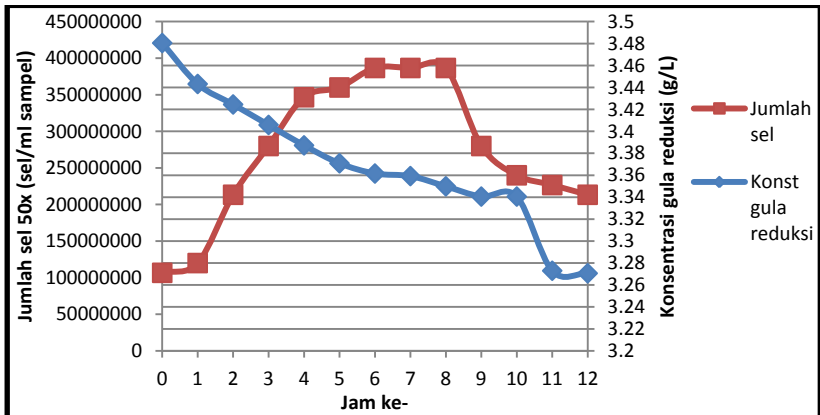
Berikut ini adalah gambar grafik konsentrasi gula reduksi atau gula sisa yang difermentasi oleh masing-masing jenis mikroorganisme.

**Gambar IV.8** Grafik Gula Reduksi Sisa sebagai Fungsi Waktu pada Fermentasi Batch dengan Mikroorganisme *Zymomonas Mobilis* Termutasi A3



Gambar IV.8 dapat menunjukkan fermentasi *batch* menggunakan *Zymomonas Mobilis* Termutasi A3 pada pengaruh perubahan konsentrasi gula reduksi sisa terhadap waktu. Dari gambar menunjukkan bahwa proses fermentasi menggunakan mikroorganisme *Zymomonas Mobilis* Termutasi A3 proses batch menunjukkan kadar gula cenderung menurun disebabkan gula yang terdapat dalam media digunakan sebagai sumber karbon bagi sel khamir untuk mensintesis energi melalui proses fermentasi etanol (Putri dan Sukandar, 2008).

**Gambar IV.9** Grafik Gula Reduksi Sisa sebagai Fungsi Waktu pada Fermentasi Batch dengan Mikroorganisme *Saccharomyces Cereviseae*



Gambar IV.9 merupakan grafik konsentrasi gula reduksi sisa yang difermentasi oleh *Saccharomyces Cereviseae*. Ketika percobaan menggunakan proses fermentasi *batch* mulai menampakkan konsentrasi gula reduksi sisa yang lebih stabil dimana kondisi ini menandakan *Saccharomyces Cereviseae* mulai mampu beradaptasi terhadap substrat dan kondisi yang diberikan. Kadar gula cenderung menurun disebabkan gula yang terdapat dalam media digunakan sebagai sumber karbon bagi sel khamir untuk mensintesis energi melalui proses fermentasi etanol (Putri dan Sukandar, 2008).

#### IV.4.3 Fermentasi kulit kopi menjadi etanol dengan *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Pada penelitian ini dilakukan proses fermentasi dimana untuk proses fermentasi dilakukan selama 48 jam agar gula reduksi sisa dapat turun secara stabil. Berikut merupakan kadar etanol (%) yang dihasilkan pada saat proses fermentasi *batch* untuk masing-masing jenis mikroorganisme.

Yield etanol setelah hidrolisis dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Yield etanol} = \frac{\text{massa etanol} \times \text{volume total} \times \text{perlenmpuan}}{\text{massa gula reduksi}}$$

Yield hasil fermentasi hidrolisat ditunjukkan pada Tabel IV.12.



**Tabel IV.12** Perbandingan Kadar Etanol untuk Proses Fermentasi *Batch* untuk Masing-Masing Jenis Mikroorganisme

No. Perco baan	Strain	Etanol (% v/v)	Rata- rata	Volume Total Campuran (ml)	Volume Ethanol (ml)	Massa Ethanol (g)	Massa Gula (g)	Massa sampel yang diinjek (g)	Yield (g/g etanol/glukosa atau xylosa)
1.	S. cerevisiae	0.0314	0.029 9	94.3041	0.0282	0.022	0.104	3.3	0.0648
2.	S. cerevisiae	0.0284							
1.	Z. mobilis termutasi A3	0.0283	0.028 4		0.0268	0.021			0.0615
2.	Z. mobilis termutasi A3	0.0284							

Pada tabel IV.12 menunjukkan bahwa berdasarkan hasil analisa *gas chromatography* untuk masing-masing proses fermentasi, kadar etanol pada fermentasi *batch* untuk *Zymomonas Mobilis* termutasi sebesar 0,0615 g ethanol/ g glukosa atau xylosa dan *Saccharomyces Cereviseae* sebesar 0,0648 g ethanol/ g glukosa atau xylosa. Dari data tersebut kadar etanol pada proses *batch* dengan mikroorganisme *Saccharomyces Cereviseae* terbukti lebih besar dibanding mikroorganisme *Zymomonas Mobilis*. Hal ini dikarenakan *Saccharomyces Cereviseae* rentan terhadap konsentrasi gula yang tinggi (>5g/L) (Ndaba et al.,2014). Dalam penelitian ini, konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan sebesar 3,4805 g/L.



## DAFTAR PUSTAKA

- Aderemi, B.O. , E. Abu, B. K. Highina. 2008, “The Kinetics of Glucose Production from Rice Straw by *Aspergillus niger*”, African Journal of Biotechnology Vol. 7 (11), 3 June, pp. 1745-1752.
- Amiri,Hamid and K. Keikhosro.2014.”Organosolv Pretreatment of Rice Straw for Efficient Aceton, Butano, and Ethanol Production”.Iran. Isfahan University of Technology. Bioresource Technology 152 p 450-456.
- Arief Budiman.2010.”Pengolahan Limbah Kulit Kopi dan Pemanfaatannya ysng menjadi Nilai Tambah dalam Kehidupan”.20 Januari 2015.
- Asgher, M., Ahmad, Z., and Iqbal, H.M.N.2013,” Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production”, Industrial Crops and Products 44:488– 495
- Badger PC. 2002. “*Ethanol from cellulose: a general review*”. Page 17-21. In J. Janick and A . whipkey (Ed). Treds in New Crops and New Uses. ASHS Press,Alexandria, VA.
- Carlos Ricardo, Luciana Porto,dkk. 2014.”*Enzymes Production During Value Addition of Agro and Industrial Wastes*”.Brazil : University Parana, Bioprocess Engineering and Biotechnology Departement.
- Dirjen Perkebunan,2008,”Data Statistik Informasi tentang Limbah Kulit Kopi”.20 Januari 2015.
- Datta, Rathin,1981,” Acidogenic Fermentation of Lignocellulose-Acid Yield and Conversion of Components”, Biotechnology and Bioengineering 23:2167-2170
- Ernes A, Ratnawati L, Wardani A, Kusnadi J.2014.”Optimasi Fermentasi Bagas Tebu Oleh *Zymomonas Mobilis* Cp4 (Nr1 B-14023) Untuk Produksi Bioetanol”.Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Brawijaya.
- Fransisca T.I.P,2012.”Produksi Etanol dari Jerami Padi melalui Hidrolisa Enzimatik dan Fermentasi”.Tesis Lab Biokim.

- Grisel Corro, Laura Paniagua, Umapada Pal, Fortino B., Minerva Rosas, 2013, "Energy Conversion and Management". Meksiko: Instituto de Ciencias, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, 4 Sur 104.
- Geng, Anli and Xin Fengxue. 2012. "Ethanol Production from Horticultural Waste Treated by a Modified Organosolv Method". Singapore. Ngee Ann Polytechnic. Bioresource Technology 104 p 715-721.
- Hamelinck C.N, Hooijdonk G.V, dkk. 2004. "Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle- and long-term". Biomass and Bioenergy (2005). 384-410.
- Hellen, K.D dan Debra A.P. (2014). "Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa dengan Hidrolisis Enzim Selulase dan Enzim Xilanase menggunakan Pretreatment NaOH dan larutan Ionic Liquid". Skripsi Lab Biokim.
- K. srilekha Yadav, (2011) memproduksi etanol dari jerami padi dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*
- Lily Surayya E. dan Dede Sukandar. 2008. "Konversi Pati Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Menjadi Bioetanol melalui Hidrolisis Asam dan Fermentasi". Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta.
- Lin, Yan and Shuzo Tanaka. 2006. "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects". Tokyo: Microbiol Biotechnol. 627-642.
- Lee, J.M. 1992, "Biochemical Engineering", Prantice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, hal. 83 – 94.
- Muhammad Asgher (2012), *pretreatment* ampas tebu dengan basa (NaOH 4%) dan ekstrak enzim *ligninolytic* (25 ml) yang dihasilkan dari *Pleurotus ostreatus* IBL-02 untuk depolimerisasi lignin dan mengekspos polimer selulosa, dilanjutkan dengan sakarifikasi dan fermentasi oleh *strain* murni *Saccharomyces cerevisiae* untuk menghasilkan bioetanol.

- Mussatto SI and J.A. Teixeira, 2010. "Lignocellulose as Raw Material in Fermentation Process". Portugal: Institute for Biotechnology and Bioengineering.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, Michael. L.. 2005. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology* 96 : 673–686
- Muthuvelayudham, R. and T. Viruthagiri. 2006, "Fermentative Production and Kinetics of Cellulase Protein on *Trichoderma reesei* Using Sugarcane Bagasse and Rice Straw", *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (20), 16 October, pp. 1873-1881.
- Nana Dyah S, Luluk Edahwati, (2011), "Bioethanol dari Limbah Kulit Kopi dengan Proses Fermentasi". Penelitian ini mengkaji tentang produk ethanol dengan proses fermentasi menggunakan *Zymomonas mobilis* menggunakan HCl 20%v dihasilkan kadar glukosa 10,04%, glukosa ini mendapat perlakuan fermentasi yang optimum selama 7 hari dihasilkan kadar ethanol 9-12%.
- Ndaba, B and I. Chiyanzu. 2014. "Effect Of *Saccharomyces Cerevisiae* And *Zymomonas Mobilis* On The Co-Fermentation Of Sweet Sorghum Bagasse Hydrolysates Pretreated Under Varying Conditions". Kenya. University of Nairobi. *Biomass and Bioenergy* 71 p.350-356.
- Rury Kurniawan dan Titik Tri Wahyuni, 2013, "Limbah Industri Perkebunan Kelapa Sawit, Kakao, Tebu Dan Kopi". Bogor: Mayor Bioteknologi Tanah Dan Lingkungan Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Sun, Ye and Cheng, Jiayang (2002), "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a Review", USA: North Carolina State University, *Bioresource Technology* 83, pp 1.

- Taherzadeh, M. And Karimi, K.2007.”Acid-based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignosellulosic Material: a Review , Bioresources 2 (3), 472-499, diambil dari Ghani Arasyid dkk, (Online), ([http://digilib.its.ac.id/public/ITS\\_undergraduate-12522-Paper.pdf](http://digilib.its.ac.id/public/ITS_undergraduate-12522-Paper.pdf)) diakses 20 Januari 2014.
- Widjaja, Arief. 2009, “Aplikasi Bioteknologi pada Industri Pulp dan Kertas”, itspress, Surabaya.
- Widjaja,Tri,dkk..2010.”Teknologi Immobilisasi Sel CA-Alginat untuk Memproduksi Etanol secara Fermentasi Kontinyu dengan *Zymomonas mobilis* Termutasi”.Surabaya. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Seminar Rekayasa Kimia dan Proses.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **V.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian dan analisa yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Hasil terbaik proses pretreatment yaitu yang menghasilkan selulosa tertinggi tetapi kadar hemiselulosa relatif tidak berpengaruh.
2. Proses pretreatment terbaik ditunjukkan pada pretreatment organosolv yaitu lignin sebesar 0,2% (w/w); selulosa sebesar 52,24% (w/w) dan hemiselulosa sebesar 11,48% (w/w) dengan menggunakan konsentrasi ethanol 50%.
3. Perolehan gula reduksi yang tinggi pada hidrolisis enzimatik berkorelasi dengan jumlah kadar selulosa dan hemiselulosa yang tinggi.
4. Proses hidrolisis dengan campuran enzim murni dan campuran crude enzim memberikan hasil produktivitas terbaik ditunjukkan pada hidrolisis menggunakan campuran enzim murni dengan variabel konsentrasi ethanol 50% yaitu 3,4805 g/L konsentrasi gula reduksi dan yield gula reduksi terbesar yaitu dengan konsentrasi ethanol 40% sebesar 0,172 gram gula reduksi/ gram selulosa+hemiselulosa).
5. Hasil *yield* ethanol tertinggi dihasilkan pada fermentasi batch dengan menggunakan variasi *Saccharomyces Cerevisiae* yaitu sebesar 0,0648 gr etanol/gr glukosa atau xilosa.

#### **V.2 Saran**

1. Crude enzim yang telah di produksi harus segera digunakan untuk hidrolisa, karena dapat menimbulkan filamen jamur di atas permukaan crude enzim.
2. Analisa terhadap sampel yang diambil harus segera dilakukan supaya tidak terjadi fermentasi lebih lanjut.



**APPENDIKS A**  
**A-1**  
**PERHITUNGAN KADAR SELULOSA,**  
**HEMISELULOSA, DAN LIGNIN PADA KULIT BIJI**  
**KOPI MENGGUNAKAN METODE CHESSON**

A.1 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin Kulit Biji Kopi Sebelum *Pre-treatment*

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,5521-0,4448)/1,0062 \times 100\% \\ &= 10,6698\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,6694-0,5521)/1,0062 \times 100\% \\ &= 11,6547\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,4448-0,0018)/1,0062 \times 100\% \\ &= 44,0241\%\end{aligned}$$

A.2 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Kulit Biji Kopi Setelah *Pretreatment* Organosolv Etanol 10%

1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,713-0,5781)/1,0078 \times 100\% \\ &= 13,386\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,8855-0,713)/1,0078 \times 100\% \\ &= 17,116\%\end{aligned}$$

3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,5781-0,0002)/1,0078 \times 100\%\end{aligned}$$

$$=57,343\%$$

#### A.3 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Kulit Biji Kopi Setelah *Pretreatment* Organosolv Etanol 20%

##### 1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,5695-0,5192)/1,0076 \times 100\% \\ &= 4,992\%\end{aligned}$$

##### 2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,6943-0,5695)/1,0076 \times 100\% \\ &= 12,386\%\end{aligned}$$

##### 3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,5192-0,0065)/1,0076 \times 100\% \\ &= 50,883\%\end{aligned}$$

#### A.4 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Kulit Biji Kopi Setelah *Pretreatment* Organosolv Etanol 30%

##### 1. Perhitungan Kadar Selulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Selulosa} &= (c-d)/a \times 100\% \\ &= (0,7263-0,6413)/1,0062 \times 100\% \\ &= 8,448\%\end{aligned}$$

##### 2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa

$$\begin{aligned}\text{Kadar Hemiselulosa} &= (b-c)/a \times 100\% \\ &= (0,8109-0,7263)/1,0062 \times 100\% \\ &= 8,408\%\end{aligned}$$

##### 3. Perhitungan Kadar Lignin

$$\begin{aligned}\text{Kadar Lignin} &= (d-e)/a \times 100\% \\ &= (0,6413-0,0017)/1,0062 \times 100\% \\ &= 63,009\%\end{aligned}$$

#### A.5 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Kulit Biji Kopi Setelah *Pretreatment* Organosolv Etanol 40%

##### 1. Perhitungan Kadar Selulosa

- Kadar Selulosa 
$$= (c-d)/a \times 100\%$$
$$= (0,5944-0,427)/1,0084 \times 100\%$$
$$= 16,5485\%$$
2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa
- Kadar Hemiselulosa 
$$= (b-c)/a \times 100\%$$
$$= (0,6916-0,5944)/1,0084 \times 100\%$$
$$= 9,634\%$$
3. Perhitungan Kadar Lignin
- Kadar Lignin 
$$= (d-e)/a \times 100\%$$
$$= (0,4275-0,0015)/1,0084 \times 100\%$$
$$= 42,248\%$$

#### A.6 Perhitungan Kadar Selulosa, Hemiselulosa, dan Lignin pada Kulit Biji Kopi Setelah *Pretreatment* Organosolv Etanol 50%

1. Perhitungan Kadar Selulosa
- Kadar Selulosa 
$$= (c-d)/a \times 100\%$$
$$= (0,5751-0,5434)/1,0012 \times 100\%$$
$$= 3,161\%$$
2. Perhitungan Kadar Hemiselulosa
- Kadar Hemiselulosa 
$$= (b-c)/a \times 100\%$$
$$= (0,7327-0,5975)/1,0012 \times 100\%$$
$$= 15,741\%$$
3. Perhitungan Kadar Lignin
- Kadar Lignin 
$$= (d-e)/a \times 100\%$$
$$= (0,54345-0,006)/1,0012 \times 100\%$$
$$= 53,691\%$$

## A-2

# PERHITUNGAN KURVA STANDAR GLUKOSA DAN XILOSA UNTUK MENGUKUR AKTIVITAS ENZIM

### Enzim Murni

#### A.1 Perhitungan Kurva Standar Glukosa

$$\begin{aligned}\text{Massa glukosa} &= 0,367 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\ \text{BM glukosa} &= 180 \text{ gram/mol} \\ \text{Mol glukosa} &= \text{massa glukosa/BM} \\ &= 0,367 \text{ gram} / 180 \text{ gram/mol} \\ &= 0,002 \text{ mol} \\ &= 2038,89 \text{ } \mu\text{mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{mol glukosa/ volume buffer} \\ &\quad \text{sitrat pH 5,5} \\ &= 2038,89 \text{ } \mu\text{mol}/100 \text{ ml} \\ &= 20,389 \text{ } \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$\begin{aligned}&= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{20,389 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\ &= 4,078 \text{ } \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

Konsentrasi di kuvet

$$\begin{aligned}&= \frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}} \\ &= \frac{4,078 \text{ } \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\ &= 0,163 \text{ } \mu\text{mol/ml}\end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi glukosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 2,5601x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi glukosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan  $x$  sebagai absorbansi.

#### A.2 Perhitungan Kurva Standar Xilosa

$$\begin{aligned}
 \text{Massa xilosa} &= 0,367 \text{ gram} \\
 \text{Volume buffer sitrat pH 5,5} &= 100 \text{ ml} \\
 \text{BM xilosa} &= 50 \text{ gram/mol} \\
 \text{Mol xilosa} &= \text{massa xilosa/BM xilosa} \\
 &= 0,367 \text{ gram} / 50 \text{ gram/mol} \\
 &= 0,00734 \text{ mol} \\
 &= 7340 \mu\text{mol} \\
 \text{Konsentrasi xilosa awal} &= \text{mol xilosa/ volume buffer} \\
 &\quad \text{sitrat pH 5,5} \\
 &= 7340 \mu\text{mol} / 100 \text{ ml} \\
 &= 73,4 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (xilosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi xilosa awal} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{73,4 \mu\text{mol/ml} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 14,68 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi di kuvet

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\text{konsentrasi di tabung reaksi} \times \text{larutan xilosa}}{\text{volume total}} \\
 &= \frac{14,68 \mu\text{mol/ml} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \\
 &= 0,5872 \mu\text{mol/ml}
 \end{aligned}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi xilosa vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 3,076x$  dengan y sebagai konsentrasi xilosa ( $\mu\text{mol/ml}$ ) dan x sebagai absorbansi.

### A-3 PERHITUNGAN ENZIM

Untuk perhitungan aktivitas enzim variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama:

$$\text{Aktifitas enzim} = \frac{(A1-A2) \times \text{slope kurva} \times V \text{ sampel}}{\text{waktu inkubasi} \times V \text{ enzim}}$$

Dimana :

A1 = absorbansi larutan sebelum koreksi

A2 = absorbansi larutan koreksi

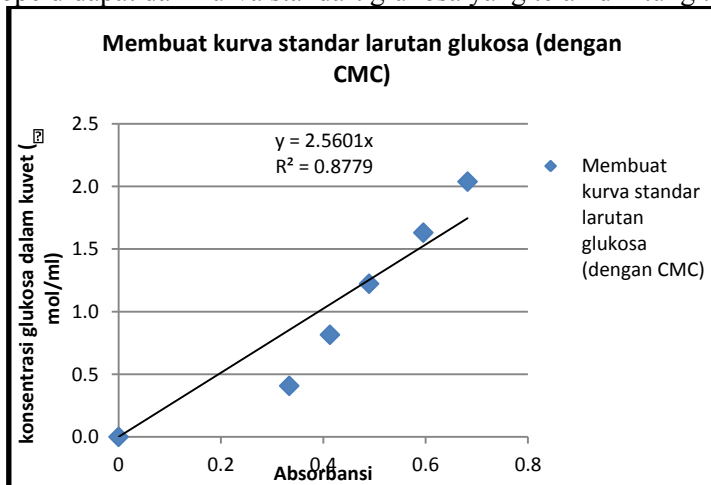
A = absorbansi larutan setelah koreksi

Volume sampel = 5 ml

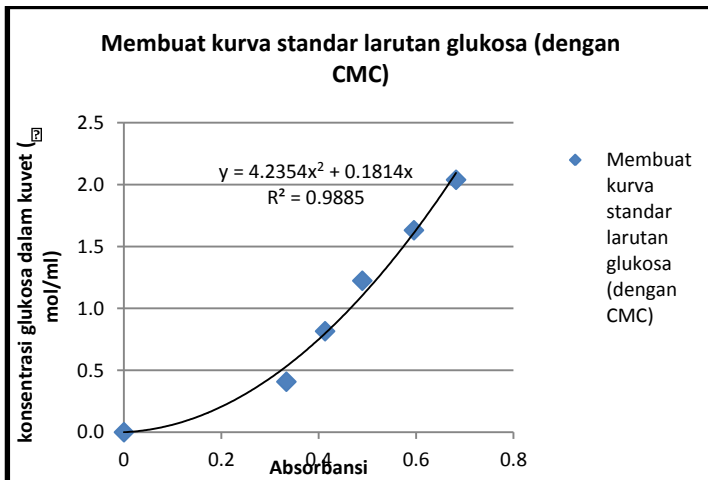
Waktu inkubasi = 10 menit

Volume enzim = 0,2 ml

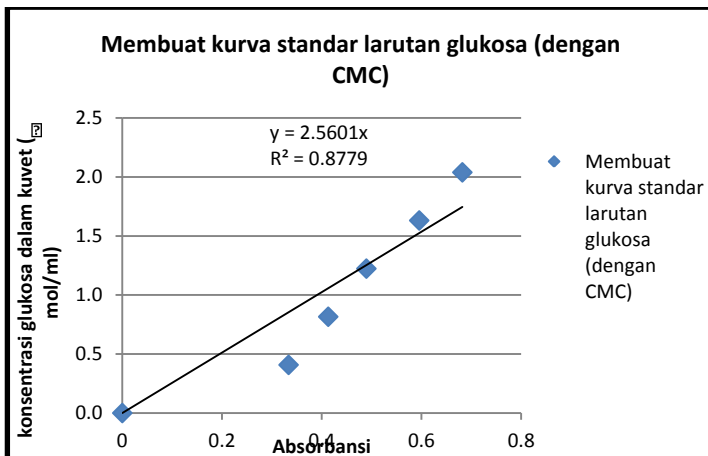
Slope didapat dari kurva standart glukosa yang telah dihitung :



Pada penelitian ini digunakan kurva linier sebagai penyederhanaan tetapi akan lebih baik jika menggunakan kurva polynomial, maka:

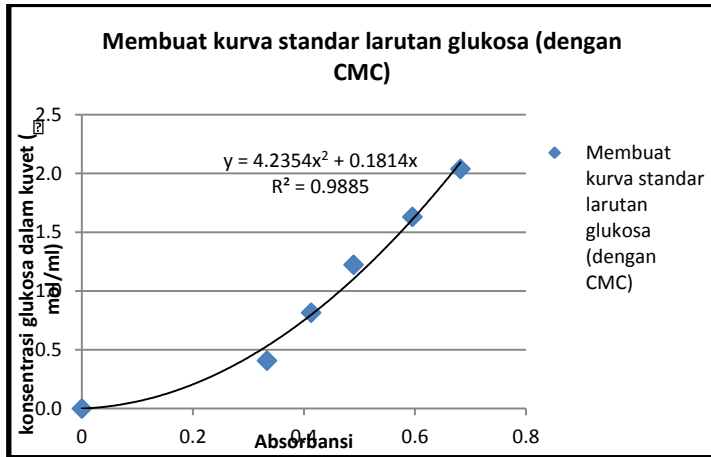


Sedangkan untuk kurva standart xilosa yaitu sebagai berikut :





Jika menggunakan kurva polynomial, maka:



### A.1 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T. reesei* dengan substrat Jerami Padi

Variasi enzim	Sebelum koreksi A1	koreksi A2	Setelah koreksi A	slope		volume sampel (ml)	waktu inkubasi (min)	volume enzim (ml)	aktivitas enzim (U/ml)		error
				linier	polynomial				s. linier	s. polynomial	
E. Selulase	0.342	0.236	0.106	2.5601	$4.2354x^2 + 0.1814x$	5	10	0.2	0.678	0.167	3.06
E. Xilanase	1.004	0.898	0.106	3.076	$7.5893x^2 - 1.0273x$				0.815	-0.059	14.80

### A.2 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *A. niger* dengan Substrat Jerami Padi

Variasi enzim	Sebelum koreksi A1	koreksi A2	Setelah koreksi A	slope		volume sampel (ml)	waktu inkubasi (min)	volume enzim (ml)	aktivitas enzim (U/ml)		error
				linier	polynomial				s. linier	s. polynomial	
E. Selulase	0.282	0.201	0.081	2.5601	$4.2354x^2 + 0.1814x$	5	10	0.2	0.518	0.106	3.88
E. Xilanase	0.935	0.820	0.115	3.076	$7.5893x^2 - 1.0273x$				0.884	-0.044	20.91

### A.3 Perhitungan Aktivitas *Crude Enzyme* dari *T.reesei* dengan Substrat Dedak Gandum

Variasi Enzim	Sebelum koreksi A1	koreksi A2	Setelah koreksi A	slope		volume sampel (ml)	waktu inkubasi (min)	volume enzim (ml)	aktivitas enzim (U/ml)		error
				linier	polynomial				s. linier	s. polynomial	
E. Selulase	0.610	0.458	0.152	2.5601	$4.2354x^2 + 0.1814x$	5	10	0.2	0.973	0.314	2.10
E. Xilanase	1.122	1.082	0.040	3.076	$7.5893x^2 - 1.0273x$				0.308	-0.072	

### A.4 Perhitungan Aktivitas *Pure Enzyme*

Variasi enzim	Sebelum koreksi A1	koreksi A2	Setelah koreksi A	slope		volume sampel (ml)	waktu inkubasi (min)	volume enzim (ml)	aktivitas enzim (U/ml)		error
				linier	polynomial				s. linier	s. polynomial	
E. Selulase	0.958	0.717	0.241	2.5601	$4.2354x^2 + 0.1814x$	5	10	0.2	1.539	0.722	1.13
E. Xilanase	2.105	0.485	1.620	3.076	$7.5893x^2 - 1.0273x$				12.458	45.633	

#### A.5 Perhitungan Kebutuhan Enzim Untuk Setiap Variabel

1. Kebutuhan enzim untuk variabel *pure enzyme* selulase dan *pure enzyme* xilanase

Kebutuhan enzim = 18,6 U/1 gr kulit biji kopi

Kebutuhan *pure enzyme* selulase

$$= \frac{\text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

aktivitas enzim

$$= \frac{18,6 \text{ U}}{1,539 \text{ U/ml}}$$

1,539 U/ml

$$= 12,086 \text{ ml}$$

Kebutuhan *pure enzyme* xilanase

$$= \frac{\text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

aktivitas enzim

$$= \frac{18,6 \text{ U}}{12,458 \text{ U/ml}}$$

12,458 U/ml

$$= 1,493 \text{ ml}$$

Total volume *pure enzyme* selulase dan xilanase = 13,579 ml

2. Kebutuhan enzim untuk variabel *crude enzyme* (2 Selulase (2T:1A) :1 Xilanase)

Kebutuhan enzim = 18,6 U/1 gr kulit biji kopi

Kebutuhan *crude enzyme* selulase *T. Reesei* dengan substrat padi

$$= \frac{2/3 \times 2/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

aktivitas enzim

$$= \frac{2/3 \times 2/3 \times 18,6 \text{ U}}{0,678 \text{ U/ml}}$$

0,678 U/ml

$$= 12,19 \text{ ml}$$

Kebutuhan *crude enzyme* selulase *A. niger* dengan substrat padi

$$= \frac{2/3 \times 1/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

aktivitas enzim

$$= \frac{2/3 \times 1/3 \times 18,6 \text{ U}}{0,518 \text{ U/ml}}$$

$$= 7,98 \text{ ml}$$

Kebutuhan *crude enzyme* xilanase *T. Reesei* dengan substrat gandum

$$= \frac{1/3 \times \text{kebutuhan enzim}}{\text{aktivitas enzim}}$$

$$= \frac{1/3 \times 18,6 \text{ U}}{0,308 \text{ U/ml}}$$

$$= 20,13 \text{ ml}$$

Total volume crude enzyme (2 S : 1 X) = 40,3 ml

## A-4

### PERHITUNGAN HIDROLISIS

#### A.1 Perhitungan Kurva Standar Gula Reduksi

$$\begin{aligned}\text{Massa glukosa} &= 0,368 \text{ gram} \\ \text{Volume buffer sitrat pH 3} &= 100 \text{ ml} \\ \text{Konsentrasi glukosa awal} &= \text{massa glukosa/ volume buffer} \\ \text{sitrat pH 3} &= 0,368 \text{ gram/100 ml} \\ &= 0,004 \text{ gram/ml} \\ &= 3,685 \text{ gram/L}\end{aligned}$$

Misalkan pada pengenceran 1:4 (glukosa : buffer sitrat)

Konsentrasi di tabung reaksi

$$= \frac{\text{konsentrasi glukosa awal} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{3,685 \text{ gram/L} \times 1 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,737 \text{ gram/L}$$

Konsentrasi di kuvet

$$= \frac{\text{konsentrasi di tab. reaksi} \times \text{larutan glukosa}}{\text{volume total}}$$

$$= \frac{0,737 \text{ gram/L} \times 0,2 \text{ ml}}{5 \text{ ml}}$$

$$= 0,029 \text{ gram/L}$$

Untuk konsentrasi yang lain, perhitungan dapat dilakukan dengan langkah yang sama. Kemudian diplot antara konsentrasi gula reduksi vs absorbansi untuk tiap pengenceran, lalu dilakukan regresi linier dan didapat persamaan  $y = 4,6624x$  dengan  $y$  sebagai konsentrasi gula reduksi (gram/L) dan  $x$  sebagai absorbansi.

## A.2 Perhitungan Konsentrasi, Massa, dan Yield Gula Reduksi

### 1. Perhitungan konsentrasi gula reduksi

Diambil salah satu data absorbansi (analisa DNS) hidrolisis enzim selulase dan enzim xilanase terbaik (2T:1A) pada jam ke-28

Absorbansi = 0,7465

$$\text{Konsentrasi gula di kuvet} = \text{Absorbansi} \times \text{slope}$$

$$= 0,7465 \times 4,6624$$

$$= 3,4805 \text{ gram/L}$$

### Konsentrasi gula di erlenmeyer

= konsentrasi gula di kuvet x volume kuvet

volume sampel

$$= \underline{3,4805 \text{ gram/L} \times 5 \text{ ml}}$$

0,2 ml

$$= 87,0125 \text{ gram/L}$$

Untuk perhitungan konsentrasi sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

## 2. Perhitungan massa gula reduksi

Diambil data hasil konsentrasi gula hidrolisis enzim selulase dan enzim xilanase terbaik (2T:1A) pada jam ke-28

Konsentrasi gula di erlenmeyer = 3,4805gram/L

Volume larutan hidrolisis (2T:1A) = 30 ml

Massa gula reduksi

= konsentrasi gula x volume larutan

$$= 3,4805 \text{ gram/L} \times (30/1000) \text{ L}$$

$$= 0.104415 \text{ gram}$$

Perhitungan massa gula reduksi variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan yield gula reduksi

Diambil data hasil massa gula hidrolisis jam ke-28 enzim selulase dan enzim xilanase (2T:1A)

Massa gula reduksi = 0,104415 gram

Massa kulit kopi yang dihidrolisis = 1 gram

Yield gula reduksi

$$= \frac{\text{massa gula reduksi}}{\%(\text{hemiselulosa} + \text{selulosa}) \times \text{massa kulit kopi}}$$

$$= \frac{0,104415 \text{ gram}}{(11,48 + 52,24)\% \times 1 \text{ gram}}$$

$$= 0,16387 \frac{\text{gr gula reduksi}}{\text{gr (selulosa + hemiselulosa) kulit kopi}}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

$$\text{ield gula reduksi} = \frac{\text{konsentrasi gula reduksi} \times \text{volume idrolisat}}{(\text{emiselulosa selulosa}) \times \text{gram kulit kopi yang di idrolisis}}$$



## A-5

### PERHITUNGAN FERMENTASI

#### A.1 Perhitungan Volume, Massa, dan Yield Ethanol

##### 1. Perhitungan volume ethanol

Diambil salah satu data analisa GC fermentasi terbaik, yaitu dengan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*.

Kadar ethanol = 0,0314034% (v/v)

Volume total di erlenmeyer

= (volume enzim selulase x 3,3 gr kulit kopi) + (volume enzim xilanase x 3,3 gr kulit kopi) +

(volume larutan buffer x 3,3 gr kulit kopi)

= (12,084 ml x 3,3 gr kulit kopi) + (1,493 ml x 3,3 gr kulit kopi) + (15ml x 3,3 gr kulit kopi)

= 39,8772 ml + 4,9269 ml + 49,5 ml

= 94,3041 ml

Volume ethanol di erlenmeyer

= (% kadar ethanol x volume total di erlenmeyer)/100%

= (0,0314034% x 94,3041ml)/100%

= 0,02961 ml

= 0,02961x10<sup>-3</sup> L ethanol

Untuk perhitungan volume sampel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

##### 2. Perhitungan massa ethanol

Diambil salah satu data analisa GC fermentasi terbaik, yaitu dengan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

$\rho$  et an ol = 789 kg/m<sup>3</sup>

Volume ethanol di Erlenmeyer = 0,02961x10<sup>-3</sup> L ethanol

Massa ethanol di erlenmeyer

= volume ethanol di erlenmeyer x  $\rho$  et an ol

$$= 0,02961 \times 10^{-3} \text{ L} \times 10^{-3} \text{ m}^3 \times 789 \text{ kg/m}^3$$

$$= 23,3659 \times 10^{-6} \text{ kg}$$

$$= 23,3659 \times 10^{-3} \text{ gr ethanol}$$

Perhitungan massa ethanol variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama.

### 3. Perhitungan yield ethanol

Diambil salah satu data analisa GC fermentasi terbaik, yaitu dengan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae*

$$\text{Massa ethanol} = 23,3659 \times 10^{-3} \text{ gram}$$

$$\text{Massa gula reduksi yang di fermentasi} = 0,104415 \text{ gram}$$

Yield ethanol

$$= \frac{\text{massa ethanol}}{\text{massa gula reduksi}}$$

$$\text{Massa gula reduksi yang di fermentasi} \times \text{massa kulit kopi}$$

$$= \frac{23,3659 \times 10^{-3} \text{ gram}}{0,104415 \text{ gram} \times 3,3 \text{ gram}}$$

$$= 0,06781 \frac{\text{gr ethanol}}{\text{gr gula reduksi}}$$

Untuk perhitungan yield variabel lainnya dapat dilakukan dengan cara yang sama

$$\text{yield et an ol} = \frac{\text{kadar et an ol} \times \text{olume total di erlenmeyer}}{100} \times \rho \text{ et an}$$

$$\text{massa gula reduksi}$$

## RIWAYAT HIDUP PENULIS



**Fixalis Oktafia**, anak pertama dari empat bersaudara yang lahir di Lumajang pada tanggal 18 Oktober 1992. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu di SDN Perak Utara IV/61 (1998-2004), SMP Negeri 5 Surabaya (2004-2007), dan SMA Negeri 8 Surabaya (2007-2010). Lalu penulis melanjutkan perguruan tinggi di D3 Teknik Kimia FTI-ITS (2010-2013), setelah itu melanjutkan ke jenjang Lintas Jalur S1 dan diterima di S1 Teknik Kimia FTI-ITS (2013-2015). Penulis pernah aktif di Jimpunana Mahasiswa D3 Teknik Kimia FTI-ITS sebagai Staf Akademik dan Kesejahteraan Mahasiswa. Penulis juga pernah kerja praktek di PT. YTL (Powerplant) dan di PT. Semen Indonesia (Persero). Untuk menghubungi penulis dapat email ke [fixalisoktafia@gmail.com](mailto:fixalisoktafia@gmail.com). Penulis memilih Laboratorium Teknologi Biokimia untuk melakukan penelitian dengan judul:

**“Studi Teknik Produksi Etanol dari Limbah Kulit Buah Kopi (*Parchment hull / endocarp*)”**

## RIWAYAT HIDUP PENULIS



**Fibrillian Zata Lini**, anak kedua dari tiga bersaudara yang lahir di Surabaya pada tanggal 29 September 1992. Penulis telah menempuh pendidikan formal yaitu di SD Ta'miriyah (1998-2004), SMP Negeri 2 Surabaya (2004-2007), dan SMA Negeri 7 Surabaya (2007-2010). Lalu penulis melanjutkan perguruan tinggi di D3 Teknik Kimia FTI-ITS (2010-2013), setelah itu melanjutkan ke jenjang Lintas

Jalur S1 dan diterima di S1 Teknik Kimia FTI-ITS (2013-2015). Penulis pernah aktif di Jimpunana Mahasiswa D3 Teknik Kimia FTI-ITS sebagai Staf Akademik dan Kesejahteraan Mahasiswa. Penulis juga pernah kerja praktek di PG Meritjan dan di PT. Semen Indonesia Tbk (Persero). Untuk menghubungi penulis dapat email ke [fibrillian@gmail.com](mailto:fibrillian@gmail.com). Penulis memilih Laboratorium Teknologi Biokimia untuk melakukan penelitian dengan judul:

**“Studi Teknik Produksi Etanol dari Limbah Kulit Buah Kopi (*Parchment hull / endocarp*)”**